

Titre: Modélisation par éléments finis de la croissance du tube pollinique.
Title:

Auteur: Pierre Fayant
Author:

Date: 2010

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Fayant, P. (2010). Modélisation par éléments finis de la croissance du tube pollinique. [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/333/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/333/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Isabelle Villemure, & Anja Geitmann
Advisors:

Programme: Génie mécanique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION PAR ÉLÉMENTS FINIS DE LA CROISSANCE DU TUBE
POLLINIQUE

PIERRE FAYANT

DÉPARTEMENT DE GÉNIE MÉCANIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE MÉCANIQUE)

JUILLET 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

MODÉLISATION PAR ÉLÉMENTS FINIS DE LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE

présenté par : FAYANT Pierre

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès Sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, D.Sc., présidente

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph.D., membre et directrice de recherche

Mme GEITMANN Anja, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

M. DUMAIS Jacques, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je désire remercier Isabelle et Anja pour leur aide, leur soutien et leur patience lors de ce projet, l'ensemble du laboratoire de l'IRBV (Institut de Recherche en Biologie Végétale) pour leur accueil et leurs conseils, en particulier Firas, Youssef, Rabah et Chloë, Orlando pour m'avoir introduit au modèle et avoir répondu à mes nombreuses questions, Jacques Dumais et Enrique Rojas pour leur contribution dans la réalisation de mon travail par le prêt de leurs données nécessaire à la validation, Carl-Éric Aubin pour m'avoir orienté sur ce projet et avoir participé à la correction de l'article, Mark pour m'avoir aidé dans la rédaction du manuscrit, les participants du congrès «Biomechanics of growth in plant biology» pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées.

J'aimerais également remercier ma famille en France et mes amis, en particulier Thomas, pour leur soutien moral et leurs encouragements. J'adresse aussi des remerciements à ma famille éloignée du Canada, notamment Aimé, Simone et Thierry, pour leur aide à mon intégration et à mon séjour ici.

Finalement, merci à Marine pour m'avoir supporté et soutenu durant cette période.

Merci à tous.

RÉSUMÉ

Dans le domaine de la biologie végétale, la reproduction sexuelle des plantes par pollinisation est un sujet d'intérêt présentant plusieurs enjeux humains et économiques. Le tube pollinique est une cellule végétale indispensable à la pollinisation des fleurs. La croissance de la cellule végétale se fait par une déformation de la paroi l'entourant sous l'effet de la pression hydrostatique interne, la turgescence. Simultanément, de nouveaux matériaux doivent être livrés vers la paroi pour empêcher qu'elle n'éclate à cause de l'amincissement causé par l'étirement. Chez le tube pollinique, l'expansion de surface est localisée à l'apex de la cellule et le résultat du processus est une protubérance de forme cylindrique. Ce mode de croissance combiné au système biologique particulier du tube pollinique en fait un modèle privilégié pour les études mécaniques des cellules végétales en croissance. De nombreux modèles portant sur la croissance apicale ont été construits afin d'étudier les paramètres et processus impliqués. Ces modèles présentent différentes manières d'aborder le problème que ce soit des approches géométriques, mathématiques ou mécaniques mais dans chacun des constantes demeurent comme l'axisymétrie du tube. La méthode des éléments finis permet de représenter des formes complexes ou de changer facilement les modèles mathématiques utilisés pour les calculs. Ce potentiel est particulièrement adapté pour l'étude de structures biologiques amenées à changer de forme ou de propriétés mécaniques. Cette approche de modélisation par éléments finis a été privilégiée dans ce projet.

Le premier objectif de ce projet de maîtrise visait à développer un modèle par éléments finis représentant la croissance du tube pollinique permettant de changer facilement les paramètres mécaniques, géométriques et de chargement du tube pollinique. Le modèle a été construit en se basant sur l'observation expérimentale, soit un long cylindre avec un rayon de 6 μm , terminé par un apex de la forme d'un sphéroïde prolate. La paroi, d'une épaisseur moyenne fixée à 50 nm, a été modélisée par des éléments de type SHELL 181 via un maillage structuré. Ces éléments possèdent un comportement de type «coque» adéquat pour représenter la paroi et pourraient être modifiés dans le futur pour intégrer la viscoplasticité. Le tube a cependant été soumis à un comportement linéaire élastique dans un premier temps. Le coefficient de Poisson utilisé était alors fixé à 0.3. Les principaux paramètres du modèle incluaient entre autres les modules d'Young de la paroi cellulaire ainsi que leur gradient le long du tube, dans le but de tenir compte

de la composition biochimique de la cellule très variable entre l'apex et la partie cylindrique du tube. Afin de couvrir un grand nombre de cas possibles, des valeurs différentes pour le module d'Young du matériau composant la paroi cellulaire ont été assignées dans les directions longitudinale (parallèle à l'axe du tube) et transversale (tangente à la paroi). De plus, les valeurs d'élasticité longitudinale étaient de 12.5 MPa à l'apex et jusqu'à 4000 MPa dans la partie distale. Afin de représenter les gradients de modules, deux coefficients multiplicatifs m_L et m_T , variant respectivement entre 1.5 et 3 et entre 0.5 et 3, ont été mis en place. Le gradient des modules d'Young a alors été défini en combinant ces coefficients et la séparation du tube en sept domaines de taille paramétrée le long de son axe. Afin de modéliser la croissance, une pression interne de turgescence, variant entre 0.1 et 0.4 MPa, a été simulée à l'intérieur du tube. Dans le but de réduire les temps de calcul, seul un quart du tube était représenté et les conditions aux limites correspondaient alors à la fixation des déplacements radiaux et longitudinaux sur chacune des bordures. L'application de cette pression interne couplée aux conditions limites entraînait une déformation de la paroi et représentait un cycle de croissance. Suite à l'atteinte de l'équilibre, la géométrie du modèle était mise à jour pour cet état de grandes déformations, puis la pression interne était appliquée à nouveau et ce, pour le nombre de cycles de croissance requis.

Le second objectif de ce projet de maîtrise visait à valider géométriquement le modèle par éléments finis développé, pour le cas d'une croissance unidirectionnelle, à l'aide de résultats expérimentaux. Deux méthodes ont été mises en place. La première méthode de validation a consisté à vérifier le caractère «self-similar» de la croissance, i.e. une croissance du tube conservant la même forme à l'apex et en formant un cylindre de plus en plus long. La deuxième méthode de validation a repris des résultats expérimentaux sur l'évolution de traceurs à la surface du tube, i.e. les trajectoires de billes fluorescentes déposées sur la paroi et suivies durant la croissance. Le principe consistait à retracer ces trajectoires dans les simulations et à les comparer avec celles de l'expérience. L'ensemble de ces deux méthodes a permis de s'assurer que le choix final pour les paramètres du modèle était bien conforme à la réalité.

Afin d'obtenir une croissance unidirectionnelle pour laquelle la forme de l'apex reste constante, trois plans d'expérience ont alors été réalisés successivement s'affinant au fur et à mesure grâce à la modification planifiée du gradient du module d'Young. La première série de 64 simulations, comportant des variations sur les deux coefficients multiplicatifs m_L et m_T ainsi que sur la

répartition angulaire des sept domaines paramétrés le long du tube, visait à éliminer un certain nombre de combinaisons par une évaluation visuelle des résultats à l'aide de la première méthode de validation. Elle a permis de constater que, de manière générale, une paroi constituée de matériau isotrope permet de mieux représenter une croissance durant laquelle l'apex conserve sa forme à la différence d'un matériau orthotrope. Afin de tenir compte de cette première conclusion, le deuxième plan de 32 combinaisons comportait uniquement des simulations avec une paroi isotrope ($m_T=1$, variation de m_L et de la distribution d'angle). L'évaluation des résultats de ces deux séries de simulations a alors été effectuée de manière qualitative à l'aide des deux méthodes de validation. Il apparaissait qu'augmenter m_L ou m_T provoquait une diminution progressive du diamètre du tube à chaque pas et inversement. Cette constatation a donc permis de préciser l'influence des paramètres afin d'obtenir le dernier plan, soit huit simulations (choix des meilleurs résultats du plan précédent) répondant davantage aux exigences de conservation de la forme et d'évolution surfacique. Ces dernières combinaisons ont alors été soumises à une validation quantitative permettant d'aboutir à des données justifiant le choix du modèle final.

Quelques limitations ont été identifiées dans ce projet, principalement reliées à la modélisation par éléments finis. Dans les simulations, la modélisation de la croissance du tube, qui requière la redéfinition systématique de la géométrie à chaque cycle, entraîne de faibles erreurs (d'un ordre de grandeur très inférieur à la taille de la structure) dans la reconstruction de la géométrie du tube. En effet, les points de contrôle du maillage sont définis par leurs coordonnées mais lors de la redéfinition de la géométrie ces points doivent s'adapter à la répartition prédéfinie des angles qui doit rester constante. Ces différences sont cependant atténuées par la possibilité d'augmenter la précision du maillage. Par ailleurs, la définition discontinue du gradient de module d'Young, entraînant des écarts plus ou moins importants entre chacun des sept domaines, pourrait entraîner des concentrations de contraintes dans la paroi du tube. Aucune anomalie particulière qui pourrait être due à ces discontinuités n'a cependant été détectée dans les résultats.

Le travail réalisé a apporté de nombreux résultats très concluants sur la distribution des propriétés mécaniques dans la paroi du tube pollinique. La combinaison de paramètres qui produisait un tube parfaitement cylindrique et "self-similar" dans le temps, et un patron de déformation similaire à celui observé en expérience, était caractérisée par un gradient de module d'Young isotropique dont la forme correspondait à la répartition des matériaux dans la paroi. Le tube

pollinique est entouré d'une couche polysaccharidique riche en pectine. Tandis qu'à l'apex la pectine a un degré élevé de méthyl-estérification, ces polymères sont dé-méthyl-estérifiés en se déplaçant vers la partie cylindrique. La des-estérification de la pectine entraîne une modification de la rigidité et la localisation spatiale de ce changement chimique se retrouve exactement à l'endroit de changement le plus prononcé de la rigidité de la paroi qui avait été prédit par le modèle.

L'étude de l'influence des différents paramètres a permis de déterminer que la pression, le rayon du tube ou l'épaisseur de la paroi (si elle est changée uniformément) ont un impact minime sur la l'évolution qualitative de la forme du tube en croissance. Parmi les paramètres mécaniques et géométriques étudiés, seul le gradient du module d'Young a entraîné des modifications de formes. Le résultat d'une telle manipulation des propriétés mécanique a déjà été démontré dans les expérimentations biologiques. Il apparaissait aussi dans les simulations que chaque combinaison semblait converger vers un diamètre du tube propre aux paramètres utilisés. Cet aspect montre que le modèle parvient à se stabiliser et ce phénomène pourrait être utilisé afin de trouver un gradient «idéal» par l'établissement d'une relation unissant les paramètres. Enfin, il pourrait aussi être envisagé d'apporter plusieurs éléments afin d'améliorer le réalisme biologique tels que l'intégration de la structure interne de la cellule, de la distinction des matériaux de la paroi ou encore le phénomène d'apport de matériau.

Le modèle développé pourrait dans le futur être modifié et exploité afin de simuler les croissances particulières telles que le gonflement, le rétrécissement ou les changements de directions. L'ensemble de ces améliorations permettront d'obtenir un modèle réaliste et fonctionnel du processus de croissance du tube pollinique et de ses anomalies potentielles. Enfin et surtout, l'outil de modélisation ainsi créé mènera à une meilleure compréhension dans ce domaine particulier de la biologie par l'apport de nouvelles données.

ABSTRACT

In the field of plant biology, sexual reproduction through pollination is a topic of interest since it affects human life and economic issues. The pollen tube is a plant cell that is indispensable for the pollinisation of flowers. Plant cell growth occurs by a deformation of the surrounding wall under the effect of an internal hydrostatic pressure, the turgor pressure. At the same time, new material has to be delivered to the wall in order to prevent bursting caused by the thinning of the wall that in turn is a result of the turgor induced stretching. In the pollen tube, surface growth is located at the apex of the cell and it leads to the formation of a cylindrical protuberance. This type of growth, combined to the particular biological system of the pollen tube, provides an excellent model for mechanical studies of growing plant cells. Numerous models for apical growth have been used to study the parameters and processes involved. These models present different methods to approach the problem whether it is geometrical, mathematical or mechanical. However, most of these models depend on the axisymmetry of the tubular structure. The finite element method allows one to represent complex shapes or to easily change the mathematical models used for calculation. This potential is particularly suited for the study of biological structures that are able to change shape or to manipulate their mechanical properties. The finite element modeling approach has been adopted in this project.

The first objective of this project was to develop a finite element model representing the growth of the pollen tube that would allow to easily change mechanical parameters, geometry and loading. The model was constructed based on experimental observation. It consisted in a long cylinder with a radius of 6 μm , terminated by an apex shaped as a prolate spheroid. The wall, with an average thickness fixed at 50 nm was modeled by elements of type SHELL 181 via a structured mesh. These elements behave as a thin "shell" and are thus an appropriate choice to represent the relatively thin wall of the pollen tube. Although they offer the possibility to incorporate viscoplastic material properties, we have chosen a linear elastic behavior for this first version of the model. The value for Poisson's coefficient was fixed at 0.3. The main parameters of the model included the Young's modulus of the cell wall and its gradient along the tube, in order to take into account the changing biochemical composition of the cell wall between the apex and the cylindrical region. To cover a large number of possible cases, different values for

the Young's modulus of the cell were assigned in the longitudinal (parallel to the tube axis) and transverse directions (tangential to the wall). The longitudinal elasticity values were determined to be 12.5 MPa at the apex and up to 4000 MPa in the distal region. To manipulate the gradient in Young's modulus, the tube was separated into seven domains of parameterized size along its longitudinal axis, and two coefficients, m_L and m_T , were introduced. m_L links the Young's modulus of a given surface domain to that of the apex and ranges between 1.5 and 3. m_T determines anisotropy within a given domain and ranges between 0.5 and 3. To model growth, an internal turgor pressure, varying between 0.1 and 0.4 MPa, was simulated inside the tube. In order to reduce computation time, only one quarter of the tube was represented and the boundary conditions corresponded to the fixation of radial and longitudinal edges. The application of this internal pressure coupled with boundary conditions resulted in a deformation of the wall and represented one growth cycle. After achieving equilibrium, the geometry of the model was updated for this state of large deformation and internal pressure was applied again. This process was repeated for the required number of cycles to produce a significant amount of growth.

The second objective of this project was to geometrically validate the finite element model developed for the case of unidirectional growth. This validation was based on a comparison with experimental results. Two methods were developed for this purpose. The first validation method determined the degree of temporal self-similarity of the growth process, i.e. the ability of the simulation to produce a tube with unchanged shape at the apex and increasing length of the cylindrical region. The second validation method used experimental results showing the displacement of tracers placed on the surface of the tube. These trajectories were marked by fluorescent beads deposited on the wall and monitored during growth. These trajectories were reproduced in the simulations and compared with experimental data. Together these methods enabled us to identify a parameter combination that generates a growth pattern similar to that produced by a real pollen tube.

To obtain a unidirectional growth for which the shape of the apex remains constant, three sets of simulations have been performed in order to cover a large number of combinations. The first set of 64 simulations was based on variations of the two coefficients m_L and m_T and of the angular distribution of the seven parameterized domains along the tube. Visual assessment of the results suggested that a cell wall consisting of an isotropic material represents pollen tube growth better

than a wall made from orthotropic material. Subsequently, a second set of 32 combinations was tested, including only simulations with an isotropic wall ($m_T=1$, variation of m_L and angle distribution). Visual assessment of these two set of simulations showed that an increase in m_L or m_T caused a gradual decrease of the tube diameter at each step and vice versa. Eight simulations were then chosen based on this set and subjected to quantitative comparison using our two validation methods. Finally, we identified one parameter combination that best reproduced the self-similar pattern of apical growth in pollen tubes.

The Finite Element Method, although very versatile, also had limitations. Systematic redefinition of the geometry at each cycle resulted in minor errors during reconstruction of the tube geometry. These were, however, an order of magnitude smaller than the size of the structure. The reason for these errors was the fact that the control points of the mesh are defined by their coordinates, but that in redefining the geometry these points had to adapt to the predefined distribution of angles, which in turn needed to remain constant. These errors were minimized, however, due to the high density of the mesh used here. Furthermore, the definition of the discontinuous gradient in the Young's modulus leads to small stress concentrations at the domain boundaries. However, this did not significantly affect the deformations and the final shape.

This work has allowed us to make conclusions on the distribution of mechanical properties in the wall of the pollen tube. The combination of parameters that produced a perfectly cylindrical tube and that was self-similar in time, was characterized by a gradient of isotropic Young's modulus whose shape corresponded to the distribution of material in the wall. The pollen tube is surrounded by a polysaccharide layer rich in pectin. While at the apex the pectin has a high degree of methyl-esterification, these polymers are de-methyl-esterified moving towards the cylindrical part. The de-esterification of pectin causes a change in the rigidity of this material and the spatial location of the change in chemical configuration was found exactly where the most pronounced change in the rigidity of the wall was predicted to be.

Furthermore, The study of the influence of different parameters determined, that the pressure, the radius of the tube or the thickness of the wall (as long as it is modified uniformly) have minimal impact on the qualitative change in the shape of tube growth. Among the mechanical and geometrical parameters that were studied, only the gradient of Young's modulus resulted in shape changes. The result of such manipulation of mechanical properties has already been demonstrated

in biological experiments. It also appeared in the simulations that most combinations seemed to converge to a tube diameter corresponding to the parameters used. This aspect shows that the model succeeds in stabilizing and this phenomenon could be used to find an «ideal» set of parameters. Finally, several improvements can be envisaged for future versions of the model that could render it even more biologically relevant like the integration of the internal cellular structures, the distinction between different types of materials composing the wall or the phenomenon of material supply. The developed model could be modified and exploited in the future to simulate specific growth phenomena such as swelling, tapering or changing direction. All these improvements will lead to a realistic and functional model of pollen tube growth and its potential anomalies. Finally and most importantly, the modeling tool created will lead to a better understanding in this particular field of biology by providing guidance for new experimentation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Aspects biologiques.....	4
1.1.1 Cellule végétale	4
1.1.2 Le tube pollinique.....	4
1.1.3 Croissance du tube pollinique	9
1.2 Aspects géométriques.....	10
1.3 Aspects mécaniques	12
1.3.1 Pression de turgescence.....	12
1.3.2 Comportement mécanique et évolutions des propriétés.....	13
1.4 Modèles existants	14
1.5 Éléments finis	22
CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET ET CADRE METHODOLOGIQUE.....	25
CHAPITRE 3 ARTICLE <i>FINITE ELEMENT MODEL OF POLAR GROWTH IN WALLED CELLS</i>	27
3.1 Introduction	30
3.2 Construction of the finite element model and validation methods.....	32

3.2.1	Geometry and meshing.....	33
3.2.2	Mechanical Properties	34
3.2.3	Validation of the model.....	37
3.3	Results	39
3.3.1	Identification of crucial parameters.....	39
3.3.2	Quantitative validation of selected parameter combinations	45
3.3.3	Effect of geometry and turgor pressure	46
3.3.4	Comparison with experimentally determined spatial distribution of cell wall components.....	48
3.3.5	Removal of pectin disturbs cell shape determination.....	49
3.4	Discussion	51
3.4.1	Mechanics of growth in walled cells.....	51
3.4.2	Information gained from the finite element approach.....	52
3.4.3	Impact of a mechanical model of tip growth.....	53
3.4.4	Limitations of the finite element approach	54
3.4.5	Potential of the finite element approach for modeling complex geometries.....	55
3.5	Experimental procedures.....	56
CHAPITRE 4	DISCUSSION GÉNÉRALE	59
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	62
BIBLIOGRAPHIE	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Modèles sur le tube pollinique	16
Tableau 1.2: Modèles sur le tube pollinique (suite)	17
Tableau 3.1: Supplemental table 1	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Parcours du tube pollinique du point d'atterrissage du grain sur le stigmate, à travers le pistil, jusqu'aux ovules. (Figure par Firas Bou Daher).....	5
Figure 1.2: Architecture du tube pollinique	8
Figure 1.3: Augmentation et diminution du diamètre (source Youssef Chebli)	11
Figure 1.4: Changement de direction de croissance du tube pollinique (source Gossot [9]).....	12
Figure 1.5: Modèles de la croissance apicale de Da Riva Ricci (1972) (A) et de Denet (1996) (B)	18
Figure 1.6: Illustration du modèle de Bartnicki-Garcia basé sur un «Vesicle Supply Center» (VSC) qui serait le lieu d'origine de vésicules livrant du matériel à la paroi en expansion...	19
Figure 1.7: Décomposition de la paroi cellulaire en plusieurs points du modèle de Dumais	20
Figure 1.8: Modèle EF de J-F Bolduc, Source J-F Bolduc 2006 [34].....	22
Figure 1.9: Exemple d'éléments finis (source Aide Ansys 11.0)	23
Figure 1.10: Élément SHELL181.....	24
Figure 3.1: Differential interference contrast micrographs of in vitro growing lily pollen tubes. .	33
Figure 3.2: Finite element structure of a tip growing cell	36
Figure 3.3: Subset of simulations showing the deformation of the cell wall structure after 50 load cycles.	41
Figure 3.4: Spatial distribution of the Young's modulus in meridional direction of a representative subset of simulations.	43
Figure 3.5: Quantitative validation of simulations.....	45
Figure 3.6: Effect of cell wall thickness, turgor pressure and tube diameter on the growth pattern.	47
Figure 3.7: Spatial distribution of cell wall components in in vitro growing lily pollen tubes.....	49

Figure 3.8: Effect of pectin digestion on pollen tube shape.....	50
--	----

INTRODUCTION

Dans le domaine de la biologie végétale, la reproduction sexuelle des plantes par pollinisation est un sujet d'intérêt présentant plusieurs enjeux humains et économiques. De nombreuses recherches portent sur la compréhension de certaines cellules à la base de ce processus, en particulier celle du tube pollinique. Cette cellule a pour rôle d'apporter les cellules spermatiques males du grain de pollen aux ovules contenant les cellules œufs femelles, entourés par le tissu pistillaire de la fleur. Les mécanismes permettant ce transport ainsi que la façon dont cette simple cellule parvient à effectuer un si long trajet à travers des tissus plus ou moins rigides, à l'intérieur de quelques heures, ne sont pas complètement et clairement définis. Comme toute cellule végétale, le tube pollinique s'allonge par une déformation de la paroi qui l'entoure, forcée par la pression interne ou turgescence. Simultanément, de nouveaux matériaux doivent être livrés vers la paroi pour empêcher qu'elle n'éclate à cause de l'amincissement causé par l'étirement. Ce processus de croissance doit donc se produire de manière extrêmement bien contrôlé entre la déformation mécanique et l'assemblage nouveau de l'enveloppe cellulaire. Contrairement à la plupart des autres cellules végétales, ce processus de croissance pour le tube pollinique est limité à une petite région de la surface cellulaire qui est localisée à son extrémité. Ce phénomène est nommé croissance apicale et il est également réalisé dans d'autres cellules avec capacité invasive telles que les hyphes fongiques et les poils racinaires. Le résultat de ce processus de croissance est une protubérance parfaitement cylindrique d'une longueur pouvant atteindre plusieurs centimètres.

Malgré le fait que la composition biochimique de la paroi cellulaire du tube pollinique soit assez bien caractérisée, l'interaction des molécules structurales, telles la pectine, la cellulose ou encore la callose, leur permettant de produire une cellule fonctionnelle d'une forme très spécifique et d'un mode de croissance très efficace, n'est pas clairement déterminée. Étant donné que les composants biologiques même à l'échelle microscopique doivent obéir à des lois physiques, ce problème pourrait profiter d'une collaboration de la biologie avec la mécanique ou encore la physique. Une approche interdisciplinaire est requise pour clarifier les principes fondamentaux qui, d'un côté contrôlent la croissance de cette cellule en particulier, et qui de l'autre côté pourraient être la clef des principes généraux du développement végétal.

À cause de sa géométrie simple, le processus de croissance apicale a attiré différentes approches mathématiques dans le passé. Les premiers modèles géométrique de Da Riva Ricci [1] et mathématique de Denet [2] proposent des évolutions très simples avec peu de paramètres et l'utilisation de théories de base. À cause de leur simplicité, ils sont fortement limités dans leur réalisme biologique. L'intégration progressive de concepts, comme l'apport de matériaux nécessaires pour l'assemblage de la paroi à partir d'une structure intracellulaire, nommée le «Vesicle Supply Center» [3], de propriétés et de comportements mécaniques de la paroi cellulaire, a ensuite mené aux modélisations de la croissance apicale plus récentes comme celles de Goriely [4] ou de Dumais [5]. Chacun de ces modèles possède un certain degré de réalisme mais aucun n'englobe tous les paramètres qui caractérisent le tube. Même si cela est irréalisable, il reste possible de s'en approcher. On peut par exemple noter dans la plupart des modèles l'incapacité de représenter les formes et évolutions anormales (gonflement, rétrécissement ou changement de direction). Plus important encore, tous les modèles publiés sont strictement dépendants d'une géométrie axisymétrique et ne peuvent pas facilement être adaptés à des situations ou des géométries plus complexes.

L'objectif de cette étude était de développer un modèle mécanique de la croissance de la cellule végétale qui offre la flexibilité de s'adapter à des géométries plus complexes. C'est pourquoi l'approche de modélisation par éléments finis a été privilégiée dans ce projet. Cette méthode se base sur la décomposition de structures en une multitude d'ensembles simples. La possibilité de modifier à souhait la géométrie de forme complexe, de changer les paramètres mécaniques simplement dans différents endroits du système que l'on représente (ici les cellules végétales) et d'obtenir des résultats rapidement et simplement font de la méthode par éléments finis l'outil idéal pour approfondir les recherches biomécaniques au niveau cellulaire. L'utilisation des capacités de ce type de modélisation permet, par essais successifs, de converger vers des solutions acceptables en comparaison avec l'expérience réelle du point de vue de la forme et de la morphogénèse.

Ce projet constituant la première approche de modélisation de la croissance cellulaire végétale par éléments finis, une géométrie simple du tube pollinique en croissance régulière a été développée pour construire un premier modèle, par la suite soumis à différentes étapes de validation. L'utilisation du tube pollinique, un modèle biologique très bien étudié par de

nombreux groupes de recherche, m'a permis de comparer les simulations du modèle avec le comportement biologique de la cellule. En plus, les prédictions faites par mon modèle ont pu être comparées avec celles obtenus par d'autres types de modélisation publiées auparavant.

Ce mémoire présente donc les résultats du développement et de l'analyse d'un modèle par éléments finis du tube pollinique et de son processus de croissance. Le Chapitre 1 comporte une revue des connaissances pertinentes au sujet, suivi du Chapitre 2 qui résume la rationnelle du projet ainsi que ses objectifs. Le Chapitre 3 regroupe les méthodes utilisées et les principaux résultats obtenus sous forme d'un article scientifique. Une discussion générale, les améliorations à apporter et l'utilisation future possible du modèle sont détaillées dans le Chapitre 4.

CHAPITRE 1 REVUE DES CONNAISSANCES

1.1 Aspects biologiques

1.1.1 Cellule végétale

La cellule végétale est généralement composée d'un noyau autour duquel se trouve un cytoplasme (totalité du matériel cellulaire), le tout entouré d'une membrane cellulaire ainsi que d'une paroi cellulaire. Cette paroi est relativement flexible dans les cellules en croissance et se rigidifie lors de la différenciation, i.e. lors de l'acquisition de fonction spécialisées, de ces dernières. La présence de cette paroi à l'extérieur de la cellule végétale la distingue de la cellule animale tant du point de vue du comportement biologique que mécanique. La paroi cellulaire possède plusieurs aspects particuliers. Elle a une résistance mécanique relativement importante grâce à l'agencement des différents matériaux la composant. Elle est principalement composée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines), mais contient aussi des protéines, des ions et de l'eau. La paroi du tube pollinique se distingue des parois cellulaires des autres types de cellules par son contenu réduit en cellulose, son abondance en pectine et son épaisse couche intérieure de callose. Le rôle de ces différents composants sera présenté plus en détails à la section 1.1.2.2. Il est aussi important de différencier la paroi primaire de la paroi secondaire. La paroi primaire doit à la fois être résistante aux sollicitations mécaniques en tension et offrir une certaine plasticité permettant la croissance cellulaire. Dans certains tissus, les cellules développent une paroi secondaire, située en dessous de l'autre, qui est plus rigide et ne permet plus la croissance.

1.1.2 Le tube pollinique

Le tube pollinique est un type de cellule végétale qui, malgré son aspect simpliste, est une structure extrêmement efficace dont le métabolisme a un seul but - l'élongation rapide qui permet une pollinisation efficace et compétitive. Malgré le fait qu'il s'agit d'une cellule végétale typique, le tube pollinique possède de nombreuses caractéristiques qui le distinguent des autres cellules végétales, telle sa manière de croître ou sa composition biochimique, qui seront détaillés dans les sections suivantes.

1.1.2.1 Processus de pollinisation

Le tube pollinique correspond à une extension du gamétophyte mâle qui se forme à l'intérieur des anthères lors du développement des fleurs. Après d'être relâché par l'anthère, le gamétophyte, ou grain de pollen, en se déposant sur le pistil d'une plante réceptive, se met à germer. Commence alors la formation du tube pollinique, qui va ensuite croître rapidement et de la manière la plus directe possible vers l'ovule de la plante pour le féconder. L'objectif du tube est donc la création d'un chemin pour les cellules spermatiques qui doivent être transportées du grain de pollen vers le gamétophyte femelle. Pour ce faire, le tube pollinique doit traverser une grande distance relativement à son échelle et se frayer un chemin à travers les tissus de la fleur (Fig 1.1).

Durant cette croissance, le grain émet une protubérance dont seul l'apex, i.e. la région à l'extrémité de la cellule, grandit et ce, de manière unidirectionnelle. Les matériaux constituant la paroi évoluent donc en termes de composition au fur et à mesure de l'élongation du tube pour obtenir des propriétés mécaniques assurant cette croissance particulière [6]. Ce matériel nécessaire pour assembler la paroi et assurer sa croissance est amené à l'apex par l'intermédiaire de vésicules [7].

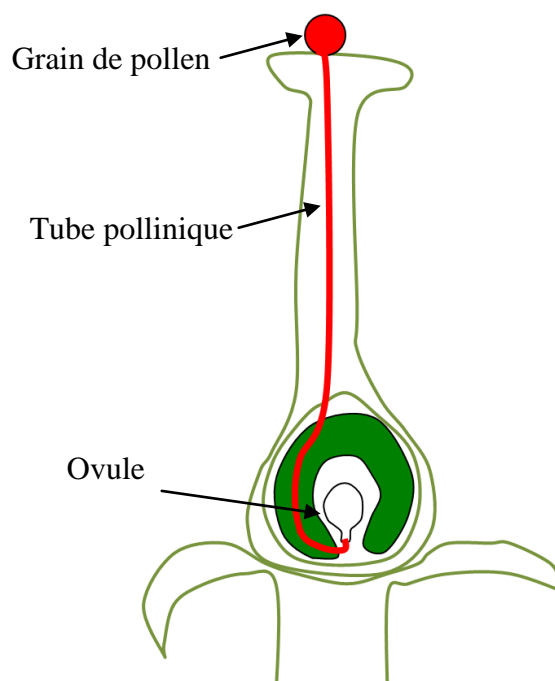


Figure 1.1: Parcours du tube pollinique du point d'atterrissage du grain sur le stigmate, à travers le pistil, jusqu'aux ovules. (Figure par Firas Bou Daher)

1.1.2.2 Composantes structurales du tube pollinique

Cytosquelette

A l'intérieur des cellules végétales un système de transport assure le déplacement de matériaux entre les différents compartiments de la cellule et entre l'intérieur et la périphérie. Le transport se fait par des protéines motrices qui bougent sur un système de "rails", le cytosquelette, composé des filaments d'actine et des microtubules. Dans le tube pollinique ces structures contribuent à transporter et mettre en place les matériaux nécessaires à la croissance et à la maintenance de la cellule.

Les filaments d'actine et les microtubules traversent le cytoplasme du tube pollinique en direction parallèle à l'axe longitudinal [8] (Fig. 1.2). Tandis que le tube peut croître parfaitement en absence des microtubules [9], le système des filaments d'actine est primordial pour la croissance de la cellule. Les filaments d'actine sont présents dans les régions centrales et périphériques du tube et forment un réseau plus dense dans la région subapicale (Fig. 1.2). Dans le contexte de la croissance, la fonction cruciale des filaments d'actine inclut surtout le transport de vésicules porteuses de pectine de l'endroit de leur formation (appareil de Golgi) à l'endroit de la fusion avec la membrane plasmique (apex du tube). Le transport de ces vésicules suit un patron très spécifique qui assure que les pectines soient ciblées exactement à la région de surface qui subit l'expansion lors de la croissance [7, 10, 11].

Chez les cellules animales le cytosquelette joue un rôle important dans la migration des cellules. Dans ces cellules, la polymérisation des filaments d'actine est capable de déformer la membrane plasmique et ainsi de déformer la surface cellulaire [12]. Ceci change la forme cellulaire et rend ces cellules capables de se déplacer relativement au substrat. Chez les cellules végétales la surface cellulaire est trop rigide pour que la force de polymérisation des filaments d'actine puisse causer sa déformation [13]. Cette force est plutôt fournie par la turgescence. Ainsi, le rôle mécanique du cytosquelette dans la croissance des cellules végétales se limite probablement à la livraison ciblée de matériaux et d'enzymes envers la surface cellulaire. Pour le tube pollinique cette livraison doit se faire sur des distances très élevées et d'une façon extrêmement ciblée à cause de la petite taille de la région cellulaire en croissance par rapport à la taille totale du tube.

Paroi cellulaire

La paroi cellulaire du tube pollinique comprend plusieurs matériaux qui contribuent à l'obtention de propriétés bien spécifiques à ses fonctions de croissance entre autres [6]. Parmi les plus importants dans leur rôle et leur présence, on trouve la pectine, la cellulose et la callose.

- La pectine :

La pectine est déposée à la surface de la cellule végétale par exocytose (fusion de vésicules porteuses avec la membrane plasmique) qui, dans le tube pollinique, a lieu seulement à l'apex. Elle est sécrétée dans cette zone sous sa forme méthyl-estérifiée (Fig. 1.2), forme apportant des propriétés mécaniques de faible dureté. Lors de la maturation de la paroi, les pectines sont démethyl-esterifiées par l'enzyme pectin methyl esterase. Ainsi, la portion cylindrique du tube est entourée par une couche de pectines démethyl-estérifiées formant la surface extérieure de la paroi. Ce changement de configuration chimique en allant de l'apex de la cellule vers la région cylindrique permet aux ions de calcium de gélifier la pectine, ce qui rend ce matériau plus solide et plus résistant dans la région subapicale [14].

- La cellulose :

La cellulose est une composante importante de la paroi cellulaire végétale car elle est présente sous forme de microfibrilles cristallines qui confèrent à la paroi une résistance contre les contraintes tensorielles. Les microfibrilles sont liées par des xyloglucanes. Dans le tube pollinique, la présence de cellulose est inhabituelle de part sa plus faible abondance et sa disposition. La cellulose se retrouve soit entre la couche extérieure de pectine et celle de callose ou associée avec les deux (Fig. 1.2). Les microfibrilles sont orientées de façon aléatoire dans l'apex tandis que dans la partie cylindrique ils montrent une orientation préférentielle ayant un angle bien inférieur à 45° avec l'axe du tube lorsque l'on s'en éloigne. Cette disposition engendre en partie les propriétés mécaniques favorisant une stabilité du tube envers des forces mécaniques externes appliquées en direction longitudinale par son activité d'invasion [15].

- La callose :

La callose est une composante de la paroi cellulaire végétale qui généralement est produite seulement après application de liaisons. Dans le tube pollinique cette molécule est présente en abondance, car elle est déposée sous forme de bouchons qui séparent la partie apicale vivante du cytoplasme des régions distales qui vont dégénérer dans des très longs tubes. La callose est déposée aussi le long de la paroi latérale et se situe sur la partie interne de celle ci (Fig. 1.2). Elle est cependant totalement absente de l'apex et de plus en plus importante en s'en éloignant [14]. Il s'agit d'un composant amorphe mais il joue un rôle dans la stabilité contre la pression de turgescence comme il a été montré par micro-indentation [14]. Les données ont en effet révélé qu'une diminution du taux de callose entraînait une réduction de la dureté cellulaire et une augmentation de sa viscoélasticité.

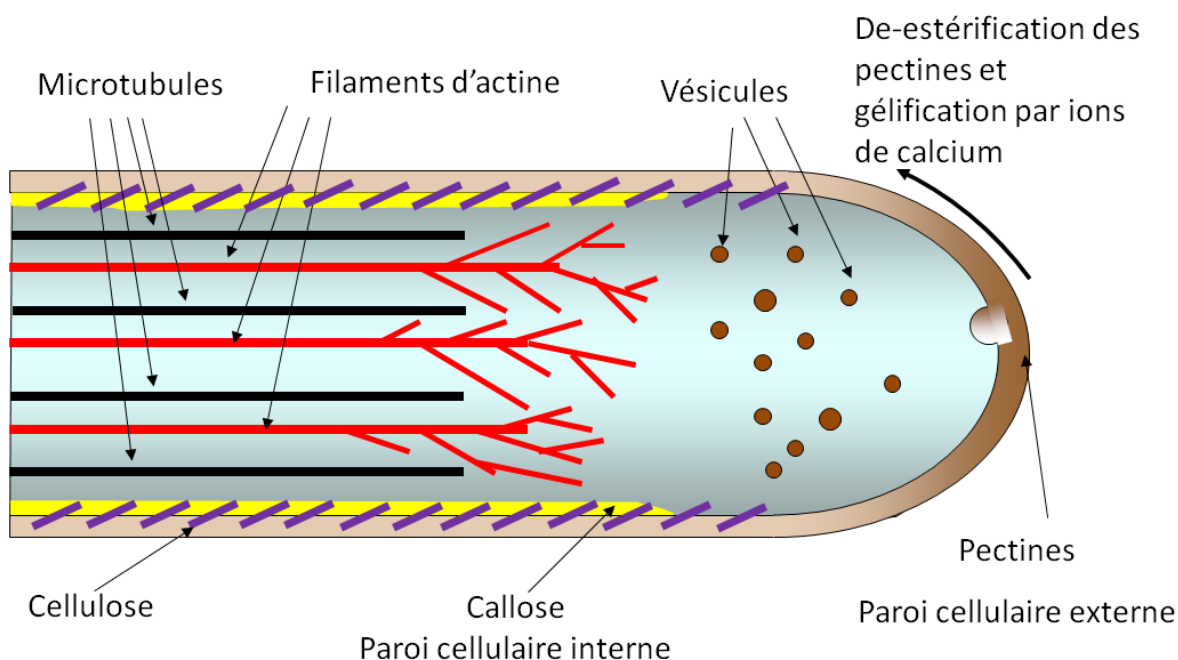


Figure 1.2: Architecture du tube pollinique

1.1.3 Croissance du tube pollinique

La croissance cellulaire peut être vue de la même manière sur les plantes et les champignons, dont les cellules sont entourées par une paroi. On peut la définir comme une augmentation constante du volume de la cellule ce qui implique que la paroi cellulaire augmente également en surface et en volume [16]. Cette croissance est supportée par une pression interne ou turgescence déformant la paroi cellulaire [17] sous apport de nouveaux matériels nécessaires à la construction de la cellule. Les effets mécaniques de la pression de turgescence sur la paroi interne de la cellule engendrent donc sa croissance, elle-même contrôlée par la composition de la paroi. La structure de la paroi cellulaire est donc une partie importante à comprendre afin d'explicitier le processus de croissance. C'est pourquoi de nombreuses études portent sur la structure mécanique ou biologique afin d'interpréter les variables biophysiques au niveau moléculaire (Voir section 1.4).

De plus, la croissance du tube pollinique est extrêmement rapide et unidirectionnelle dans la plupart des cas malgré quelques exceptions qui seront évoquées dans la section 1.2. Le fait que cette croissance soit localisée à l'apex du tube, i.e. croissance apicale, la différencie de la croissance diffuse (croissance de tout côté) beaucoup plus répandue [18]. Ce type de croissance apicale se retrouve dans des cellules comme les poils racinaires ou les hyphes par exemple. Cet aspect est déterminé par l'apport de matériaux nécessaires à l'assemblage de la paroi dans une très petite région de la surface de la cellule, l'apex, et, en conséquence, un flux vésiculaire bien ciblé vers cette région [10]. L'étude de ce type de cellule est alors facilement exploitable en laboratoire afin d'obtenir de nombreux résultats dans un délai assez court. Cette particularité justifie l'utilisation de ce type de cellule de manière courante dans beaucoup d'études existantes.

Enfin, il faut aussi noter la présence de variation dans la vitesse d'expansion au sein d'une même cellule. La vitesse de croissance à l'apex oscille en effet avec des périodes autour de 30 à 60 secondes. Ce phénomène est étudié de façon intense car il offre la possibilité d'étudier la relation entre différents processus cellulaires et ainsi l'analyse de cause et effet [19]. Ces oscillations ont été proposées d'être causées par des changements de turgescence [20], mais l'évidence expérimentale pointe plutôt vers la paroi cellulaire comme paramètre variable dans le temps [21, 22]. Cette variation de la mécanique de la paroi pourrait être le résultat d'un taux de déposition de

pectines changeant [23], ce qui est un processus contrôlé par la concentration de calcium cytosolique [24].

1.2 Aspects géométriques

La forme la plus simple et la plus courante du tube pollinique peut être décrite comme un long cylindre de révolution dont l'extrémité a la forme d'un sphéroïde prolate. Sous une pression hydrostatique soutenue, un contenant de géométrie initiale quelconque convergera toujours vers une géométrie sphérique, du moment que les propriétés mécaniques soient uniformes tout autour. Or, l'expansion de l'enveloppe du tube pollinique se déroule de telle manière que la cellule produit un long tube parfaitement cylindrique dont le diamètre ne change pas lors du processus de la croissance. La paroi formant la partie cylindrique de la cellule doit donc résister à la force causée par la pression, tandis que seule la région de surface formant l'apex doit permettre une déformation et la croissance. La cause de ce phénomène réside dans une différence significative dans les propriétés mécaniques de ces deux régions de surface (voir section 1.3).

Une autre particularité du tube pollinique est l'épaisseur de la paroi qui ne varie pas de façon significative quand on s'éloigne de l'apex. Elle sera donc considérée comme constante dans l'étude. Les dimensions de longueur de la cellule et d'épaisseur de la paroi des tubes polliniques des espèces utilisés en laboratoire sont (valeurs d'après le laboratoire d'Anja Geitmann) :

- Diamètre du tube: 5-6 μm (*Arabidopsis thaliana*), 10-12 μm (*Nicotiana tabacum*), 17-20 μm (*Lilium longiflorum*).
- Épaisseur de la paroi cellulaire: 0.05-0.2 μm

En plus de l'évolution normale du tube, il arrive que ce dernier prenne des formes particulières. Les causes de ce phénomène sont étudiées par de nombreux laboratoires [15, 25]. Elles sont généralement expliquées comme étant le résultat d'une dépolarisation de la croissance.

Un phénomène typique est le gonflement (Fig. 1.3) qui peut se produire sous certaines conditions expérimentales comme par exemple une réduction temporaire de la pression turgescence [22]. Le

tube augmente son diamètre progressivement puis se stabilise à nouveau. Cependant, le phénomène inverse, une réduction du diamètre (Fig. 1.3), peut également se produire avec certains mutants [25]. Même si l'étude de ces mutants indique que des processus de signalisation internes avaient été affectés, il reste qu'un changement de forme cellulaire doit être causé par un effet sur la mécanique de la cellule. C'est pourquoi il est important de la comprendre pour mieux identifier les causes des changements.

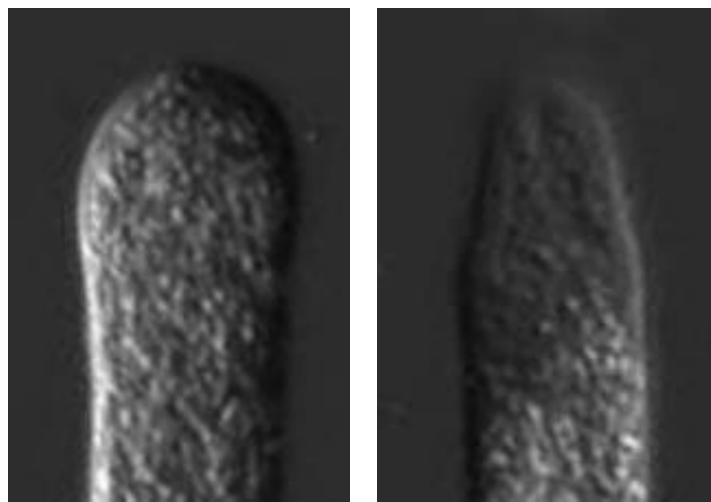


Figure 1.3: Augmentation et diminution du diamètre (source Youssef Chebli)

Enfin, une dernière modification de la forme parfaitement cylindrique se manifeste sous l'aspect d'un changement de direction [9]. Le tube pollinique est capable de modifier rapidement sa direction de croissance (Fig. 1.4). Cette capacité est cruciale pour le fonctionnement de la cellule car elle doit suivre des signaux émis par le pistil et par le gamétophyte femelle. Ce phénomène doit forcément résulter lui aussi d'un changement des propriétés mécaniques mais non symétrique cette fois.

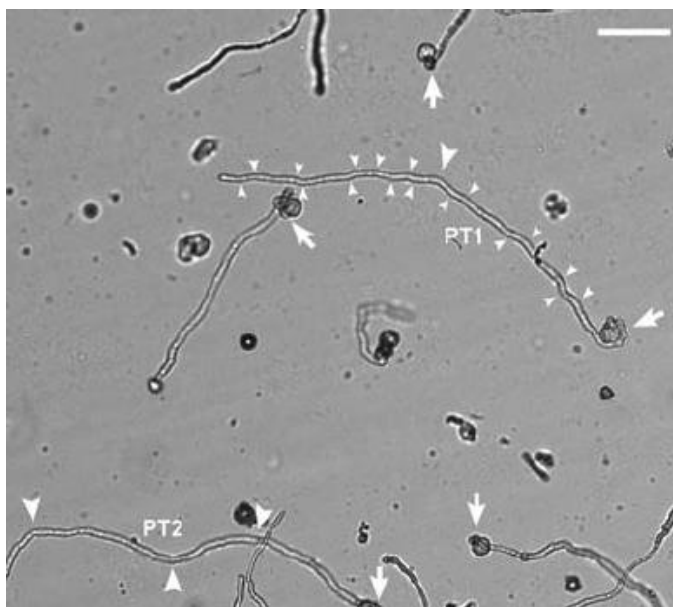


Figure 1.4: Changement de direction de croissance du tube pollinique (source Gossot [9])

Les flèches indiquent les emplacements où le tube change de direction. La taille de ces flèches montre l'importance de la déviation.

1.3 Aspects mécaniques

1.3.1 Pression de turgescence

La pression de turgescence est une pression hydrostatique générée par la différence entre la pression osmotique interne de la cellule et celle du milieu externe. Cette pression applique une contrainte constante, uniforme et multidirectionnelle sur la paroi interne du tube pollinique. Une diminution de rigidité dans la paroi entraîne alors la croissance de la cellule végétale [17]. La croissance dépend donc des propriétés mécaniques de la paroi et de la valeur de la pression de turgescence qui s'y trouve appliquée. Cette pression n'est cependant pas impliquée dans le phénomène oscillatoire de l'expansion du tube, puisqu'elle est constante dans le temps. Des études effectuées à l'aide de tests de micro-indentation [22] justifient que c'est principalement la mécanique de la paroi qui contrôle le processus. Cependant, dans ces mêmes études, une situation

expérimentale dans laquelle la pression est enlevée puis remise a montré que le processus de croissance s'interrompt puis reprend. Une seule étude a évalué la pression de turgescence dans le tube pollinique, l'absence d'autres travaux étant due aux difficultés techniques liées à ce type de mesure dans les cellules [21]. Les valeurs couramment utilisées pour la pression turgescence dans les tubes polliniques sont de l'ordre de 0.1 à 0.4MPa [21].

1.3.2 Comportement mécanique et évolutions des propriétés

La paroi du tube étant composée de plusieurs matériaux différents, dont la répartition est non-uniforme, les propriétés ne sont pas les mêmes partout, ce qui permet la croissance unidirectionnelle. C'est en particulier l'orientation préférentielle de la cellulose qui a le potentiel de rendre le comportement de la paroi non isotrope, alors que par exemple, la pectine est un composé isotrope.

Le point le plus important et le plus particulier pour le tube pollinique est donc la distribution spatiale non uniforme de ses propriétés mécaniques allant du moins rigide à l'apex au plus rigide dans la partie cylindrique [26]. Cet aspect est causé principalement par le phénomène de dé-estérification de la pectine. À l'apex la pectine est principalement méthyl-estérifiée [14], ce qui résulte en un matériau globalement moins dur et plus malléable. Lorsque l'on s'éloigne de la zone apicale, le degré d'estérification diminue, rendant ainsi le tube de plus en plus rigide et indéformable. C'est ainsi que l'on retrouve une progression du module d'Young allant du plus faible au plus fort. Il est important de noter que l'on ne dispose pas de valeurs absolues pour la rigidité mais que les résultats de la micro-indentation indiquent que le module d'Young évolue d'une dizaine de MPa à l'apex à quelques centaines dans la partie distale.

Enfin, bien souvent, la paroi cellulaire est considérée comme ayant des propriétés viscoplastiques [5, 27], sa déformation est donc entre autre une fonction du temps. La preuve de ce comportement viscoplastique a été obtenue en manipulant la pression turgescence dans des cellules en croissance.

1.4 Modèles existants

1.4.1 Modélisation de la croissance cellulaire expansive chez les plantes

La croissance des cellules végétales impliquant un processus de déformation de la paroi polysaccharidique sous l'influence d'une pression interne a été un sujet de modélisation mécanique depuis plus de 40 ans. Le tout premier modèle analytique tentant de simuler la croissance diffuse que l'on retrouve dans la plupart des cellules végétales était celui de Lockhart [27]. Les deux principales hypothèses de ce modèle portaient sur un équilibre élastique et sur une paroi viscoélastique linéaire. Les conclusions ont amené à des réflexions sur la pression de turgescence et à son potentiel sur la croissance. Par la suite, les études se sont intéressées aux comportements de la paroi. On trouve alors un modèle prédisant les efforts, durcissements et pertes de la paroi en les comparant à des résultats expérimentaux [28]. Dans ce dernier, des microfibrilles de cellulose sont disposés perpendiculairement à l'axe longitudinal, ce qui renforce la paroi de façon anisotrope et permet ainsi l'expansion de la cellule dans la direction perpendiculaire à celle des microfibrilles.

D'autres modèles plus récents utilisent une méthode dite de la «perte de stabilité» [29] qui consiste à augmenter la pression de turgescence jusqu'à une valeur critique entraînant ainsi une détente des contraintes dans la paroi cellulaire. Cette technique permet de caractériser le comportement de ces contraintes lors de relaxation. L'article de Geitmann et Ortega [26] amène une explication synthétique aux différentes manières de modéliser la croissance ainsi qu'aux équations biophysiques connues. Il apporte de nombreuses informations notamment sur les variables qui apparaissent dans plusieurs phénomènes et leur influence comme par exemple au niveau du taux de la croissance ou encore de la pression. Cet article comprend également une synthèse sur les différents modèles mathématiques représentant la paroi cellulaire. Enfin, le modèle de Dyson et Jensen [30] est une représentation théorique de la croissance cellulaire. Sa particularité est de posséder une paroi cellulaire composée d'une fine couche fibreuse et visqueuse entourée de deux plaques rigides. Encore une fois, cette étude permet de mieux appréhender l'influence de différents paramètres ou mécanismes sur la croissance comme par exemple l'importance de l'orientation des microfibrilles.

1.4.2 Modélisation de la croissance apicale

La simple géométrie axisymétrique et le phénomène de croissance locale chez les cellules à croissance apicale a attiré de nombreuses tentatives de modélisation de ce processus.

Beaucoup des modèles existants représentant la croissance sont analytiques ou géométriques. Ceux-ci sont résumés dans le tableau 1.1.

Note : La plupart des modèles ne précisent pas la plage de paramètres utilisés dans les simulations et présentent seulement un ou deux résultats. Ceci est dû au fait que ces modèles sont analytiques et étudient donc davantage l'influence des paramètres sur leurs équations qu'une réelle comparaison avec la réalité biologique.

Tableau 1.1: Modèles sur le tube pollinique

Année	Équipe	But(s)	Hypothèse(s)	Géométrie	Mécanique	Valeurs d'entrée	Validation	Avantage(s)	Limite(s)
1972	DaRivaRicci, Kendrick	Analyser le processus de croissance de l'hyphe fongique comme un déplacement des surfaces en fonction du temps dans une direction commune.	<ul style="list-style-type: none"> - L'augmentation de l'aire est proportionnelle à l'aire initiale. - Les surfaces se déplacent de manière perpendiculaire à la surface initiale (pas de glissement). 	Surface de rotation. Symétrie par rapport à l'axe. Apex sphérique.	Purement géométrique. Une fonction θ est introduite qui pourrait englober tous les paramètres mécaniques mais elle n'est pas expliquée en ce sens.	Non décrites	Pour chaque choix de θ , les auteurs comparent leurs solutions sur l'expansion de la cellule avec l'observation expérimentale.	Configuration très réaliste pour la géométrie résultante (d'après l'auteur)	Hypothèses simplistes. Pas de prise en compte de propriétés mécaniques.
1996	Denet	Résoudre numériquement un modèle dans lequel un morphogène est localisé à l'extérieur de la cellule.	<ul style="list-style-type: none"> - La vitesse normale est une fonction de la concentration du morphogène. - Relation linéaire pour le flux normal. 	Définie par une équation géométrique fonction de la courbure, d'une coordonnée curviligne et de 3 paramètres. Reprend la forme habituelle ellipsoïdale.	La construction du modèle prend en compte dans certaines variables différents phénomènes existants (comme la pression) mais ils ne sont pas quantifiés. La rigidité de la paroi est prise en compte avec une équation.	a et b sont 2 coefficients régissant la vitesse de croissance. δ correspond à une rigidité «effective» - a varie entre 33 et 66 - b varie entre 2.5 et 5.5 - δ varie entre 0.1 et 10	Comparaison visuelle avec les observations expérimentales sur les croissances des cellules.	Permet de changer les paramètres géométriques correspondants à différents cas. Permet de tirer quelques conclusions qualitatives telles que l'importance d'avoir une grande rigidité de la paroi pour obtenir une croissance cylindrique.	Quelques équations simplistes et peu de paramètres présents.
2000	Gierz, Bartnicki-Garcia	Développer un modèle 3D pour l'hyphe fongique à partir du modèle 2D existant [31]. Ce modèle 2D était décrit par une simple équation qui prenait en compte le nombre de vésicules par unité de temps et d'angle et l'avancement du Vesicle Supply Center (VSC) (colonne géométrie)	<ul style="list-style-type: none"> - La forme géométrique de l'apex reste constante durant la croissance. - Des nouvelles surfaces sont introduites au fur et à mesure pour garder l'épaisseur de la cellule constante. - L'apport complexe de matériau à la surface de la cellule n'est pas pris en compte, c'est simplement une augmentation générale de la masse. - Une infime partie des nouvelles surfaces sont insérées dans la surface existante. 	Tube infini avec apex grandissant. Concept de Vesicle Supply Center (VSC): sorte d'entité discrète à l'intérieur de l'apex du tube et qui se déplace selon l'axe à la vitesse v_t .	Prise en compte de la vitesse de croissance. Introduction d'un coefficient d'anisotropie.	Non décrites	Comparaison possible de la trajectoire de points à la surface de la cellule avec l'expérience.	Le coefficient d'anisotropie permet de choisir le comportement de la structure simplement et de le faire varier à souhait. Modèle 3D. Cependant l'auteur indique qu'il est préférable de continuer à utiliser un modèle 2D car il répond largement aux besoins, le modèle 3D étant plus un challenge mathématique.	Le gradient de formation de la cellule spécifié par le processus VSC ne suffit pas à décrire la structure en 3D.

Tableau 1.2: Modèles sur le tube pollinique (suite)

Année	Équipe	But(s)	Hypothèse(s)	Géométrie	Mécanique	Valeurs d'entrée	Validation	Avantage(s)	Limite(s)
2003	Goriely, Tabor	Construire un modèle de l'hyphe fongique réaliste et un mécanisme de croissance correct pouvant être comparé avec l'expérience.	<ul style="list-style-type: none"> - La cellule est modélisée comme une membrane élastique. - La résistance en cisaillement et en flexion est négligée. - La structure demeure axisymétrique. 	Modèle 3D axisymétrique construit par rotation d'une courbe autour de l'axe.	<p>Croissance par la pression turgescente.</p> <p>Théorie de grandes déformations élastiques.</p> <p>Relations linéaires pour les contraintes dépendantes des propriétés physiques.</p> <p>Coefficients caractérisant les propriétés élastiques de la cellule.</p> <p>Certains modules dépendent de la géométrie.</p> <p>Le phénomène d'ajout de matière est représenté par une re-paramétrisation de la structure une fois l'équilibre atteint.</p>	<p>Pour une simulation typique (unités non définies) :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ratio d'extensibilité : $\mu=1/2$ -Longueurs de la région apicale : $\sigma_1=\pi/12$ $\alpha=1/8$ -Pression : $P=1$ -Pression effective dans les régions distales : $\beta=10^{-6}$ 	Le modèle est capable de représenter des comportements que l'on observe dans la théorie comme les changements de morphologies dues à une variation de pression.	<p>Peut représenter de nombreux effets comme les contraintes externes ou les variations de module élastique.</p> <p>Le modèle peut s'appliquer même dans des cas de pression faibles ou nulles.</p>	Le modèle ne peut pas représenter au mieux le phénomène de transport de matière par vésicules.
2006	Dumais, Shaw, Steele, Long, Ray	Développer un modèle qui intègre deux processus : la déposition du nouveau matériau et les déformations mécaniques.	<p>Le taux de déposition de nouveau matériau est le même que celui de la croissance.</p> <p>La pression turgescente agit dans le plan de la cellule et les efforts normaux sont ainsi négligeables.</p>	<p>Axisymétrique.</p> <p>La géométrie est ensuite discrétisée en N points du sommet de la cellule à la base.</p>	<p>Intégration de la viscoplasticité à l'aide de l'équation de Bingham.</p> <p>Utilisation de la pression turgescente.</p> <p>Comportement transverse isotropique (mais étudie aussi le comportement anisotrope).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Épaisseur de la paroi : 0.1-0.5 μm - Rayon de courbure : supérieur à 0.5μm 	X	Fourni un modèle biophysique explicite de la croissance.	X
2007	Bernal, Rojas, Dumais	Développer, mettre en parallèle et comparer un modèle simple avec le «Rubber balloon».	Le profil du taux de déformation ne dépend pas fortement du comportement de la cellule.	Long cylindre surmonté d'un dôme.	<p>Le modèle utilisé sera un modèle linéaire simple avec des propriétés isotropes (malgré l'expansion de la surface inhomogène et anisotrope).</p> <p>Utilisation de la pression hydrostatique.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pression de gonflement : 24.3kPa -Rayon du ballon : $r_{\min}=2.32\text{mm}$, $r_{\max}=11.2\text{mm}$ -Épaisseur du ballon : 0.27mm -Coefficient de Poisson : 0.3 	Comparaison des taux de déformations et des taux de contraintes.	<p>Le modèle peut être résolu analytiquement pour une géométrie donnée.</p> <p>Modèle simple.</p>	Il s'agit juste d'une comparaison sur certains points, le parallèle ne peut pas être fait entièrement.

Les premiers modèles [1] étaient soit purement géométriques et sans intégration de paramètres mécaniques, dans lesquels les hypothèses de croissance sont simplement une croissance parallèle à l'axe et une variation d'aire proportionnelle à l'aire initiale (Fig 1.5A), ou soit purement mathématiques [2] (Fig 1.5B). Bien que ces modèles soient élégants dans leur simplicité, leur pertinence biologique est assez limitée à cause du faible nombre de paramètres constitutifs du modèle, comme par exemple l'absence d'épaisseur de la paroi ou l'anisotropie non prise en compte.

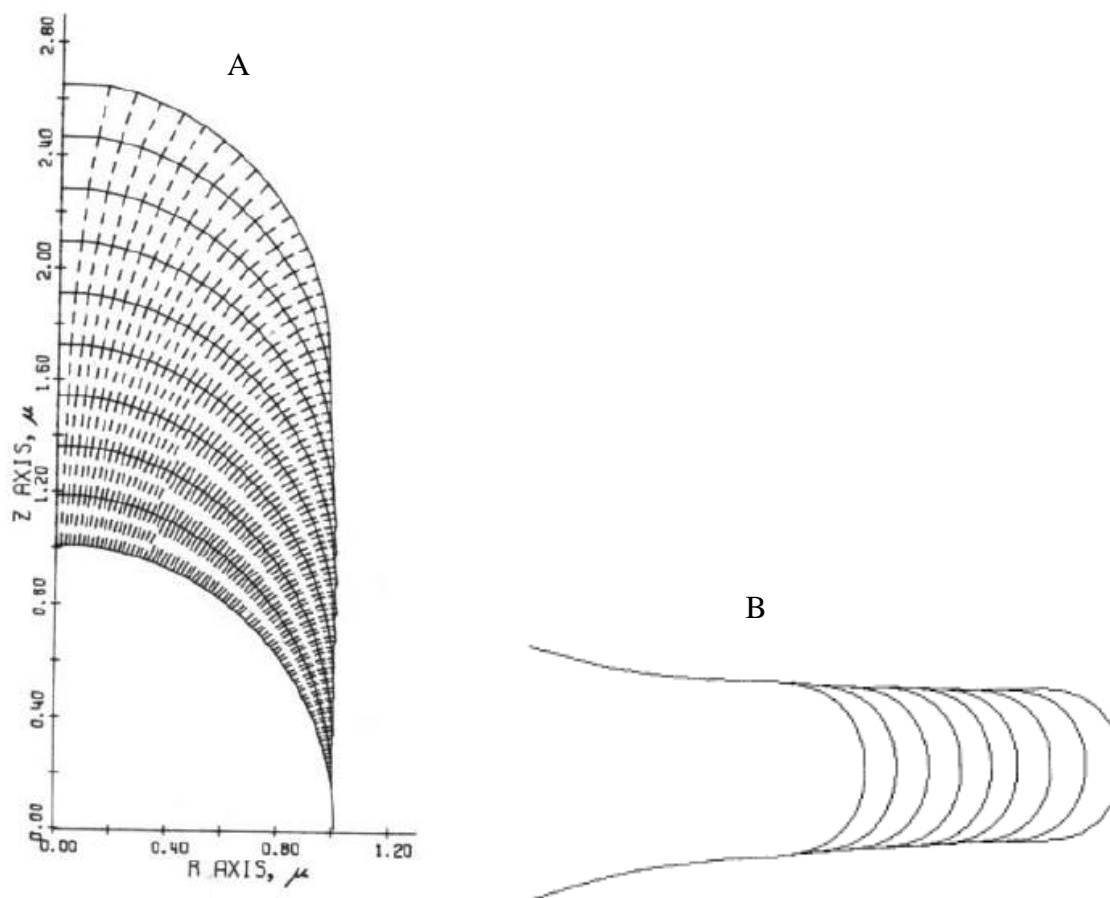


Figure 1.5: Modèles de la croissance apicale de Da Riva Ricci (1972) (A) et de Denet (1996) (B)

La figure A représente l'évolution de l'apex pour une vitesse de croissance donnée. La figure B représente l'évolution de la forme de l'apex pour une série de paramètres donnés.

Par la suite, les modèles se sont complexifiés, intégrant de nouveaux concepts comme celui du «Vesicle Supply Center» [3] (Fig 1.6) ou des propriétés et théories mécaniques supplémentaires [4]. Dans le modèle de Goriely, comme dans la plupart des autres modèles, le tube est considéré

comme axisymétrique. Un autre point intéressant à noter ici est que la croissance est provoquée par la pression de turgescence comme dans tous les modèles suivants.

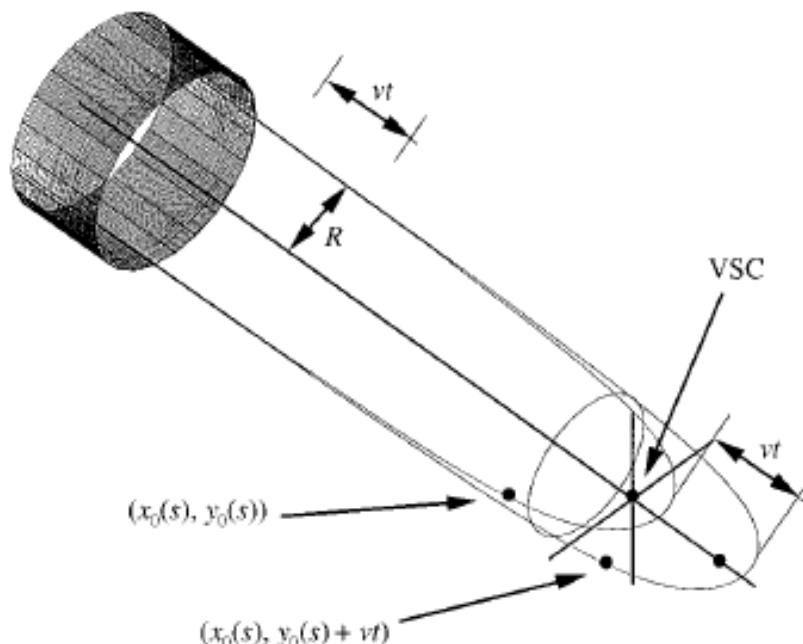


Figure 1.6: Illustration du modèle de Bartnicki-Garcia basé sur un «Vesicle Supply Center» (VSC) qui serait le lieu d'origine de vésicules livrant du matériel à la paroi en expansion.

Le paramètre v_t dirige la vitesse d'évolution du VSC le long de l'axe. Le VSC est le point d'origine de vésicules dont le rôle est d'ajouter du matériel à la paroi. Ces vésicules sont produits de manière aléatoire et dans toutes les directions à partir de ce point. À noter qu'un modèle [32] basé sur celui de Bartnicki-Garcia a été réalisé intégrant des évolutions plus réalistes pour le concept de VSC notamment sur la diffusion des vésicules et sur la manière dont celles-ci sont intégrées à la paroi.

Ensuite, deux autres travaux [5, 33] apportent de nouvelles manières de modéliser le tube et de nouvelles approches. Celui de Dumais et al. (2006) vise à modéliser deux processus, la déposition de nouveaux matériaux par l'intermédiaire de taux de déposition et les déformations mécaniques afin de fournir un modèle biophysique explicite de la croissance (Fig 1.7). Le modèle de Bernal et al. (2007) est une comparaison entre l'expansion d'un ballon gonflable et la croissance du tube pollinique. Cette étude comprend une comparaison sur certains points,

notamment la forme et les déformations. Le parallèle ne peut être fait entièrement mais les similarités sont frappantes.

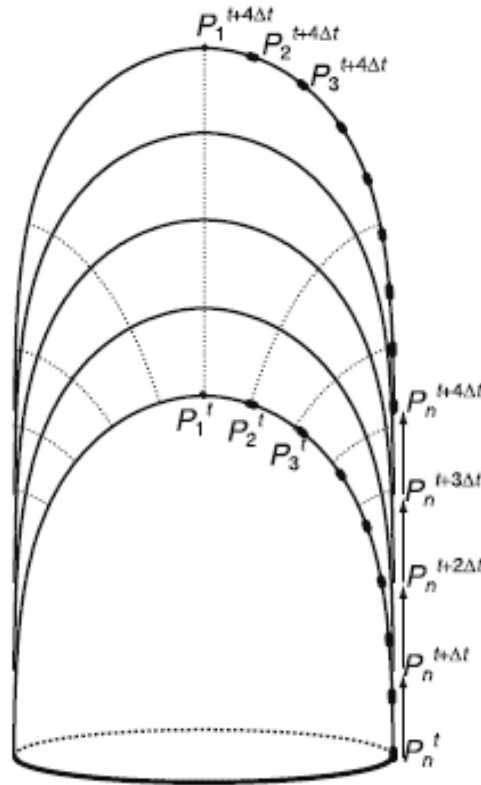


Figure 1.7: Décomposition de la paroi cellulaire en plusieurs points du modèle de Dumais

La partie méridionale de la cellule est discrétisée en n points. C'est à partir de ceux-ci qu'est définie la déformation mécanique de la paroi cellulaire.

La dynamique de la croissance du tube pollinique a aussi été modélisé par une approche complètement différente dans laquelle la géométrie du tube est plutôt négligée [24]. Dans ce modèle, le tube pollinique est représenté par deux fluides distincts séparés par une interface. De nombreux paramètres comme la pression, la tension surfacique, la densité, le taux de viscosité, la concentration d'ions calcium et l'épaisseur de la paroi y sont modélisés afin de vérifier leur influence sur le comportement oscillatoire du taux de croissance chez de nombreux tubes polliniques. Les résultats ont ensuite été soumis à comparaison avec des données expérimentales.

Il ressort alors que le calcium cytosolique posséderait un rôle important dans la création de ce phénomène oscillatoire par sa capacité d'influencer le taux de sécrétion du matériel pectique. Enfin, un dernier modèle représente la paroi cellulaire comme une coque de fluide visqueux [34] sous l'action de la pression de turgescence. De plus, un apport de matériaux a été introduit près de l'apex. Cette étude apporte des conclusions théoriques sur le rayon de la cellule et sur sa vitesse de croissance fonction de la pression et de la quantité de sécrétion de matériaux.

Cependant tous ces modèles sont limités dans leur polyvalence à la simple géométrie axisymétrique pour la croissance même s'ils peuvent expliquer l'influence de nombreux paramètres intervenant dans le processus. Ceci limite strictement ces modèles à des cellules en croissance apicale unidirectionnelle. Un changement de direction, ou une adaptation à une géométrie plus complexe n'est pas possible par une simple modification. Pourtant, un modèle qui offre des possibilités d'application plus large serait extrêmement utile. Chez les plantes il y a des types de cellule avec des géométries les plus intrigantes. Il serait donc souhaitable de créer un modèle qui malgré le fait qu'il soit initialement développé pour la simple situation axisymétrique soit facilement adaptable à ces situations plus complexes tout en intégrant un grand nombre de données et paramètres.

La modélisation par éléments finis offre cette flexibilité. Un premier modèle par éléments finis du tube pollinique a été publié [35] cependant il ne présente pas la croissance du tube mais plutôt l'importance de différents paramètres durant les phases de micro-indentation. Cette méthode constitue l'un des principaux moyens d'étudier la mécanique du tube pollinique. Elle consiste à enfoncer une aiguille très fine dans une zone ciblée du tube pollinique puis à mesurer l'effort résultant afin d'obtenir les propriétés mécaniques correspondantes.

Bien que ce modèle ne simule pas la croissance du tube, il reste intéressant dans la manière de représenter les différents ensembles intervenant dans ces opérations de mesure et surtout c'est le seul utilisant des éléments finis sur le tube pollinique. Ce modèle apporte donc de nombreuses données quant aux paramètres intervenant lors de mesures par micro indentation. Dans cette étude, le tube est représenté de manière simplifiée, la région étudiée étant celle du contact entre l'aiguille de micro-indentation et la cellule. Le maillage (voir section 1.5) et le modèle

mathématique utilisés pour cet endroit sont donc plus détaillés qu'ailleurs (Fig 1.8). Le modèle ne se préoccupe d'ailleurs pas de l'évolution des propriétés le long du tube.

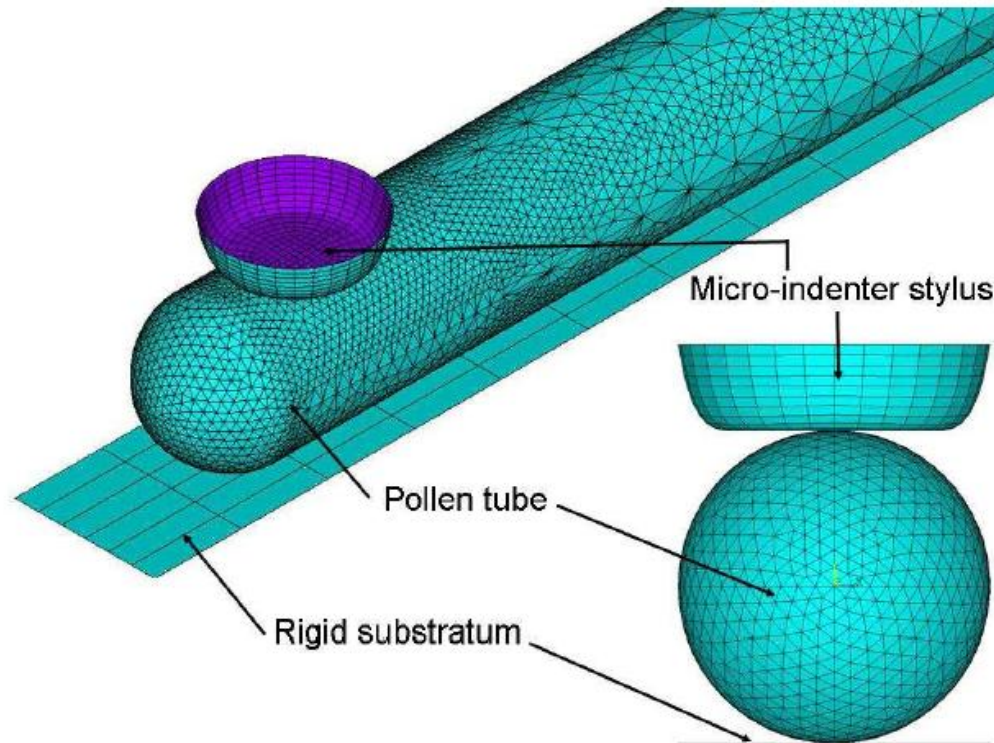


Figure 1.8: Modèle EF de J-F Bolduc, Source J-F Bolduc 2006 [35]

Le long tube horizontal représente le tube pollinique. Le début de tube vertical (zone violette) représente l'aiguille du micro indenteur. La zone en dessous sous la forme d'un rectangle représente le support. Le maillage dans la zone en contact du tube pollinique est alors différent de celui de la partie distale et de celui de l'aiguille.

1.5 Éléments finis

La méthode des éléments finis est utilisée dans de nombreux domaines afin de résoudre des problèmes plus ou moins complexes de mécanique, d'ingénierie et de physique. Dans le domaine de la mécanique du solide, son utilité principale réside dans le fait qu'elle permet de trouver efficacement les déplacements et contraintes d'un système même de forme ou composition très particulières.

L'idée générale de la méthode est de découper en une multitude de petites sections la totalité de la structure étudiée. Afin d'obtenir ces domaines, il est nécessaire de discrétiser la structure. Cela demande dans la plupart des cas de redéfinir et d'approximer la géométrie réelle. Il faut ensuite établir un maillage définissant le pavage de la structure en plusieurs ensembles qui seront les éléments finis. Il existe de nombreux types d'éléments finis, du simple cube à des plus complexes comme le tétraèdre ou encore des formes quelconques (Fig 1.9). Chaque élément possède des nœuds placés à différents endroits où seront calculées les solutions locales. Ces nœuds peuvent être aux sommets de l'élément mais aussi au milieu des arêtes ou au centre de l'élément. Le maillage ainsi établi peut être régulier mais est bien souvent dépendant de la géométrie. Il peut être davantage raffiné dans des zones critiques afin d'obtenir une meilleure précision dans ces endroits. Vient enfin l'application des propriétés mécaniques associées à chaque élément fini ou groupe d'éléments finis, du chargement et des conditions aux limites qui peuvent donc varier selon l'élément considéré.

Le principe de base de la méthode des éléments finis consiste alors à résoudre de manière discrète des équations aux dérivées partielles définies sur ces domaines et comportant des conditions aux bords afin d'assurer l'existence et l'unicité de la solution. Il est important de noter que toute solution sera donc une approximation même si celle-ci est excessivement précise. La validation de ces solutions est bien souvent effectuée par convergence, une amélioration progressive de la précision du maillage afin de s'assurer que l'on se dirige vers un même résultat. La validation inclue aussi la vérification de la réponse du modèle avec des données expérimentales ou analytiques.

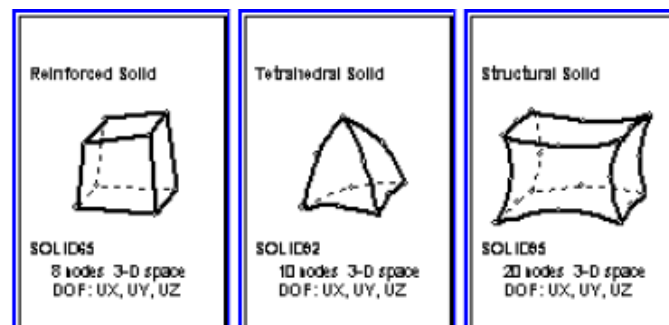


Figure 1.9: Exemple d'éléments finis (source Aide Ansys 11.0)

Il est important de noter la présence des éléments SHELL181 qui sont des éléments à 4 nœuds et 6 degrés de liberté (Fig 1.10). Les éléments SHELL sont les plus aptes à représenter une paroi car ils ont une structure de coque et intègrent donc plusieurs propriétés intéressantes pour l'étude. De plus, ces éléments disposent de la possibilité de pouvoir faire varier l'épaisseur ou de mettre en place un comportement viscoélastique ce qui est important dans l'optique de l'utilisation future de l'étude.

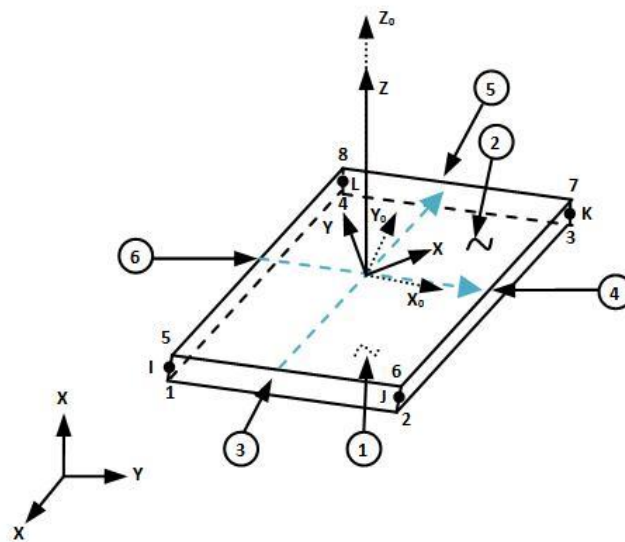


Figure 1.10: Élément SHELL181

Le choix des éléments et la manière de modéliser dépendent du problème posé. On peut prendre pour exemple le modèle éléments finis de Jean François Bolduc [35]. Celui-ci étudie l'impact de différents paramètres sur les données que l'on recueille à l'aide du procédé de micro-indentation. Il modélise donc le contact entre le tube pollinique et l'aiguille d'indentation. Le problème sera alors posé de manière à prendre en compte ces conditions. Les zones de contact auront leur maillage, leurs conditions aux limites et leur chargement propre (Fig. 1.8). Il en sera de même pour les zones éloignées. Le choix et l'application du maillage est donc crucial pour obtenir de bons résultats.

CHAPITRE 2 RATIONNELLE DU PROJET ET CADRE METHODOLOGIQUE

La revue de littérature apporte différents éléments essentiels au projet. Ils sont résumés ici :

- ❖ Le tube pollinique possède une croissance apicale unidirectionnelle.
- ❖ Les matériaux de la paroi cellulaire évoluent le long du tube pollinique, entraînant une modification correspondant dans les propriétés mécaniques.
- ❖ L'apex du tube, principalement composé de pectine, un matériau isotropique, a une forme de sphéroïde prolata dont les dimensions varient selon les espèces.
- ❖ La pression de turgescence est essentielle à la croissance. Elle est uniforme, constante dans le temps et multidirectionnelle.
- ❖ La vitesse d'expansion du tube peut varier dans le temps et il peut exister des évolutions particulières du tube pollinique telles que le gonflement, le rétrécissement ou le changement de direction de la croissance.
- ❖ De nombreux modèles portant sur la croissance du tube pollinique ont été construits afin d'étudier les paramètres et procédés intervenants. Ces modèles possèdent différentes manières d'aborder le problème que ce soit des approches géométriques, mathématiques ou mécaniques mais dans chacun des constantes demeurent comme l'axisymétrie du tube.
- ❖ La méthode des éléments finis permet de représenter des formes complexes ou de changer facilement les modèles mathématiques utilisés pour les calculs. Ce potentiel est particulièrement adapté pour l'étude de structures biologiques amenées à changer de forme ou de propriétés mécaniques.

L'analyse de ces différentes remarques amène aux questions de recherche suivantes :

Comment évoluent les propriétés mécaniques le long de la paroi du tube ? Quels sont les paramètres cruciaux qui permettent d'observer une croissance régulière et quelle est leur influence réelle sur la croissance ?

Deux objectifs ont été identifiés pour répondre à ces questions :

O1 : Développer et valider un modèle du tube pollinique permettant de représenter sa croissance.

O1a : Développer un modèle par éléments finis représentant la croissance du tube pollinique permettant de changer facilement les paramètres mécaniques, géométriques et de chargement du tube pollinique.

O1b : Valider ce modèle géométriquement pour le cas d'une croissance unidirectionnelle à l'aide de résultats expérimentaux.

O2 : Étudier les paramètres mécaniques et géométriques et déterminer leur influence et leur répartition le long du tube pollinique.

O2a : Effectuer des simulations avec variation des différents paramètres. Ces simulations devront permettre de voir un grand nombre d'évolutions possible de la croissance.

O2b : Analyser les résultats afin de déterminer l'influence de chaque paramètre ainsi que la manière dont leur répartition le long du tube pollinique joue un rôle dans la croissance.

La réalisation de ses objectifs est présentée à l'aide d'un article scientifique présenté dans le Chapitre 3. Ce dernier résume l'ensemble de la démarche qui a permis le développement du modèle, sa validation et son exploitation. Le Chapitre 4 présente des éléments de discussion sur la modélisation effectuée.

CHAPITRE 3 ARTICLE *FINITE ELEMENT MODEL OF POLAR GROWTH IN WALLED CELLS*

Ce chapitre est composé d'un article scientifique intitulé « *Finite element model of polar growth in walled cells* » qui est présentement en révision pour la revue *PlantCell*. En tant que premier auteur, j'ai effectué l'ensemble des simulations afin d'obtenir les résultats et conclusion de cette étude. Le codage pour le modèle initial, qui a été réalisé par le post-doctorant Orlando Girlanda, a été modifié dans le cadre de ce projet pour mieux s'adapter aux objectifs du projet.

J'ai écrit une première version de l'article puis effectué les modifications réclamées par les co-auteurs. Anja Geitmann a ensuite procédé à l'ensemble de la finition de l'article ainsi qu'à la soumission.

Finite element model of polar growth in walled cells

Pierre Fayant¹, Orlando Girlanda¹, Youssef Chebli², Carl-Éric Aubin¹, Isabelle Villemure¹, Anja Geitmann^{2,*}

¹École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada

²Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, H1X 2B2, Canada

*Corresponding author:

anja.geitmann@umontreal.ca, Tel : +1-514-872 8492, Fax : +1-514-872 9406

The author responsible for the distribution of material integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Anja Geitmann (anja.geitmann@umontreal.ca)

Present affiliation of Orlando Girlanda: ABB AB, Corporate Research, Forskargränd 8, 721 78 Västerås, Sweden

The formation of a cellular protuberance in walled cells requires the local deformation of the wall and its polar expansion. In many cells, protuberance elongation proceeds by tip growth, a growth mechanism shared by pollen tubes, root hairs and fungal hyphae. We established a biomechanical model of the tip growth process in walled cells using the finite element technique. The objective of this study was to identify the requirements for spatial distribution of mechanical properties in the cell wall which would allow the generation of cellular shapes that agree with experimental observation. We based our structural model on the parameterized description of a tip growing cell that allows the manipulation of cell size, shape, cell wall thickness and local mechanical properties. The mechanical load was applied in form of hydrostatic pressure. We used two validation methods to compare different simulations based on the assessment of cellular shape and on the displacement of surface markers during growth. We compared the resulting optimal distribution of cell mechanical properties with the spatial distribution of biochemical cell wall components in pollen tubes and found remarkable agreement between the gradient in Young's modulus and the distribution of de-esterified pectin polymers. This utilization of the finite element method for the modeling of non-uniform growth events in walled cells opens future perspectives for its application to complex cellular morphogenesis in plants

3.1 Introduction

Cellular growth is a fundamental process during plant development. It shapes cellular morphology, affects cell functioning and ultimately determines the plant phenotype. During expansive plant cell growth, the cell wall needs to be mechanically stretched which leads to its thinning and, vital to cell survival, new material needs to be incorporated into the existing wall to prevent fatal rupture. Growth of plant cells is thus a complex interaction between the internal turgor-generated hydrostatic pressure, which drives this process, and the surrounding cell wall, which controls its temporal and spatial dynamics [17, 26, 36]. Understanding the biomechanical underpinnings of cellular growth processes will help us to focus our attention to those cellular mechanisms and molecular pathways that govern relevant physical players involved in plant development.

Cell morphogenesis in plants comes in a wide spectrum, with diffuse growth at one end of the continuum and the highly polarized phenomenon of tip or polar growth at the other end [37]. Combinations of these two processes lead to the generation of complex plant cell geometries such as those of star-shaped astrosclereids and jigsaw puzzle-shaped leaf epidermis cells [26, 38-40]. Since the hydrostatic pressure driving cell wall stretching is a non-vectorial force, the control of the final cell shape lies in the mechanical properties of the cell wall. The diffuse increase in overall cell size, typical for example for root epidermis cells, is known to be controlled by the arrangement of the cellulose microfibrils [41]. Attempts to simulate this diffuse type of expansive growth date back to the first analytical model for cell expansion by Lockhart [27]. The constitutive equations describing growth behavior have been modified and adapted to various experimental situations [26] and efforts to mathematically account for the fiber-reinforced composite behavior of the cell wall are underway [30].

The generation of complex cellular geometries, on the other hand, represents a major challenge for analytical modeling. The reasons for the complexity of cells such as those composing the leaf epidermis are their geometry and their material properties, whose mathematical representation requires numerical modeling approaches. In engineering, the method commonly used to predict the mechanical behavior of complex structures is based on finite element (FE) modeling

techniques. For this approach, the structural system is divided into discrete areas, the elements, which are connected by characteristic key points (generally located at their corners), or nodes. The quantities of interest, stresses, strains and displacements, are evaluated at the nodes connecting different elements. The FE technique produces approximate solutions to complex problems and by doing this allows for the calculation of the behavior of structures with complicated geometry and material properties. Finite element modeling has been used recently to model the elastic, temporary deformation of plant tissues and cells under the application of temporary external loads [35, 42], but its utility for modeling the mechanics of cellular growth processes remains unexplored. Our objective was to use finite element modeling to represent a spatially confined cellular growth process in plants in order to demonstrate the potential of this approach for plant developmental research.

The experimental system chosen for our modeling approach is tip growth. Tip growth is a widespread mode of cellular morphogenesis found not only in plants (root hairs, pollen tubes), but also in animals (neurons), fungi (hyphae, budding yeasts), alga (rhizoids) and prokaryotes (streptomycetes). The defining feature of this growth process is the spatial confinement of surface expansion to the extremity of the cell. Consequently, all the key processes that control morphogenesis can be observed concomitantly in a small cellular region. The resulting structure is a tubular protrusion capped by a hemisphere- or halfellipse-shaped dome.

Among the modes of growth leading to complex geometry, tip growth has the advantage of having a simple radial symmetry. Furthermore, the growth process displays temporal self-similarity, which means that the shape profile of the apical region of the cell stays largely constant in time and simply moves forward along the longitudinal axis of the cell [4]. These features permit to easily establish quantitative validation strategies for a theoretical model. Furthermore, tip growth has attracted a number of earlier modeling attempts [4, 5, 34, 43-47] all of which have their merits and limitations. Most importantly in the present context, all of these models are essentially limited in their application to the simple, radial symmetry of the tip growing cell. Their adaptation to more complex geometries is not or not readily possible. Finite element techniques on the other hand offer this flexibility.

Tip growth is easily affected through mutation, enzymatic or pharmacological action. This interference often results in a swelling [15, 48] or tapering [49] of the tubular cell, or, in extreme

cases in the arrest of growth or bursting. A phenomenon such as apical swelling is generally claimed to be the result of a "depolarization" of the growth process, but how intracellular events are translated into a change of cellular morphology has not been examined in detail. A crucial question we wanted to address with our theoretical model concerns the nature of the changes to the cell wall mechanical properties that are implied in the generation of phenotypes that differ from the perfectly self-similar elongation pattern typical for the undisturbed cell. Geometrical and biophysical considerations dictate that the cell wall of the growing apex in tip growing cells must have a higher degree of extensibility than the cylindrical portion of tip growing cell in order to direct cellular expansion to the apex [6]. Using a finite element model we wanted to find out how exactly this mechanical gradient must be shaped in order to generate a self-similar growth pattern for a given initial shape and how changes in this gradient affect the shape of the growing tube. To demonstrate the relevance of our theoretical approach, we compared the results of the simulations with the spatial distribution of the biochemical composition of the cell wall and with the growth behavior of pollen tubes, a widely used cellular model for tip growth [6, 19].

3.2 Construction of the finite element model and validation methods

We used the finite element method (ANSYS 11.0 finite element package, Canonsburg PA) to generate a finite element mesh structure that represents the geometry of a typical tip growing cell and to model the deformation of the cell wall resulting from a hydrostatic pressure load. We constructed a shell based on a parameterized geometrical description that corresponds to the typical shape of the apical region of a pollen tube. We subdivided the structure in several ring-shaped domains along the longitudinal axis in order to be able to assign different mechanical properties to the different regions of the tube. Basic information that is required to develop an FE model includes geometry, mechanical properties, loading parameters and boundary conditions as detailed below. In order to identify the combination of mechanical properties resulting in self-similar growth, we developed a procedure to quantitatively determine the similarity of the simulation results with experimental data on cell shape and growth and hence to validate our model.

3.2.1 Geometry and meshing

Pollen tubes are cylindrical cells capped by an ellipsoid shaped apex. Using brightfield micrographs, we determined that the shape of pollen tubes is well described by a relationship of $r_L = 1.5 \times r_T$ with r_T being the radius of the tube and thus the short radius of the ellipse and r_L being the long radius of the ellipse (Fig. 3.1A). In the present model we used $r_T = 6\mu\text{m}$ unless noted otherwise. The structure of the tube was thus defined by the radius of the cylinder (r_T), the long radius of the apical ellipse (r_L) and the thickness t of the shell. For the present model, the thickness of the shell was assumed to be constant at 50 nm unless noted otherwise.

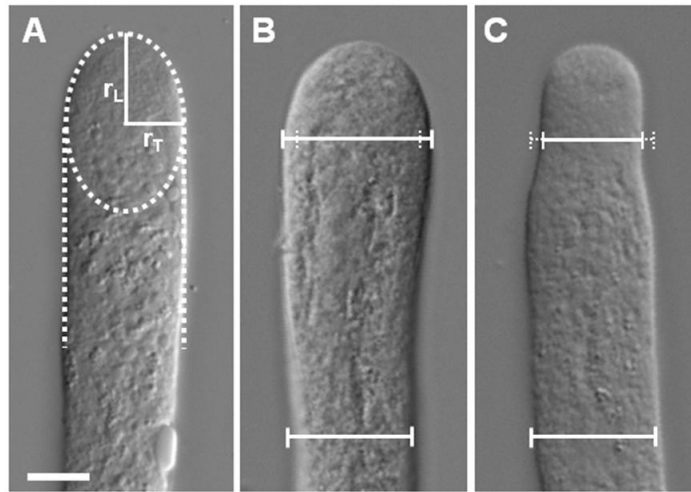


Figure 3.1: Differential interference contrast micrographs of in vitro growing lily pollen tubes.

(A) Normally growing tube. The geometry of the tube can be described with a cylinder of radius r_T capped by a half-ellipse with a short radius r_T and a long radius r_L .

(B) Tube showing a swelling apical region.

(C) Tube showing a tapering apical region.

The pollen tube shank and its apical region were meshed using user defined thickness and four-node shell type elements with 6 degrees of freedom at each node (SHELL181). Mesh density was determined through convergence testing (Figs. 3.2A, B, C).

In order to assign different mechanical properties to the shell elements depending on their position on the tube surface, the structure was divided along the longitudinal axis into seven domains, six of which were located in the ellipsoid portion and the seventh being formed by the cylindrical shank (Fig. 3.2D). The meridional lengths of domains 1 to 6 were defined by key points, which are anchor points for geometry and meshing. The position of each key point was defined by the angle θ_i that a connecting line between key point and center of the ellipse formed with the previous domain. These angles could be varied to modulate the shape of the gradient in cell wall mechanical properties. For the sets of simulations analyzed here, the sum of angles 1 through 6 was always adjusted to be 90° .

3.2.2 Mechanical Properties

The distribution of the material properties in the cell wall was chosen to correspond to the qualitative information that is available on the distribution of cell wall material in pollen tubes [15, 50, 51]. The pole consists mainly of pectin, an isotropic material. Although cellulose is present, it is randomly oriented [52]. We therefore used an isotropic material model to describe the pole region (domain 1). In the shank, cellulose microfibrils display a preferential orientation oblique to the growth axis [15, 52, 53]. It is unknown how exactly microfibrils are oriented in the regions of the apical dome located between pole and shank. Therefore, any potential anisotropy in the plane of the wall, caused by preferential orientation of cellulose microfibrils, was considered by using an orthotropic material model for domains 2 through 6.

In the model, the elastic moduli of shell elements lying within domains 1 (pole) and 7 (shank) are directly user-defined. In domains 2 through 6, the values of the longitudinal elastic moduli are linked by a factor \mathbf{m}_L . The transversal value of the elastic modulus is obtained by multiplying the longitudinal elastic modulus by a factor \mathbf{m}_T .

The increase of the longitudinal elastic modulus from one domain to the next is represented by the following rule:

$$E_{Li} = m_L \times E_{Li-1}$$

where E_{Li} is the longitudinal Young's modulus in domain i . Modulating parameter \mathbf{m}_L changes the steepness in the mechanical gradient along the longitudinal axis.

The transversal elastic modulus within each domain is then calculated by:

$$E_{Ti} = m_T \times E_{Li}$$

where E_{Ti} is the transversal Young's modulus and E_{Li} is the longitudinal Young's modulus in domain i . The parameter m_T reflects the degree of anisotropy of the material in the plane of the shell. The elastic modulus in normal direction E_{Zi} was set to always be identical to E_{Ti} .

Given that at the pole, the cell wall consists almost exclusively of pectins, we used 12.5 MPa for the elastic modulus of domain 1 [54]. The longitudinal and the transversal elastic moduli of the shank (domain 7) were chosen to be 4000 MPa to represent its large stiffness compared to the apical region of the tube. Preliminary simulations had shown that lower values would result in an increase in the tube diameter in the shank region. This increase would be incompatible with self-similarity and therefore no further tests were performed with lower values for domain 7. The Poisson's ratio was identical for all domains with 0.3 [55].

3.2.2.1 Boundary conditions

To reduce calculation time, we exploited the radial symmetry of the pollen tube and modeled only a quarter of the cylindrical structure (Fig. 3.2A). At the axisymmetric borders, radial and longitudinal translations were fixed. Vertical translation was prevented by fixing the base of the shank.

3.2.2.2 Loading parameters

The turgor pressure within the cell was represented by an internal hydrostatic pressure of 0.2 MPa, unless noted otherwise, based on the values measured in lily pollen tubes [21].

3.2.2.3 Simulation of pollen tube growth

Growth of the cell was simulated by an iterative series of loading cycles. Load was applied and the resulting deformed structure represented the starting geometry for the subsequent loading cycle. To account for the fact that continuous deposition of new cell wall material takes place during tip elongation, the structure was re-meshed after each loading cycle (Figs. 3.2B, E). This implied that in order to ensure constant mesh density, nodes were added to accommodate for the

increased length of the structure. Cell wall thickness was set back to the original value to mimic the deposition of additional cell wall material by exocytosis. Furthermore, in order to reflect the continuous maturation of the cell wall upon its displacement towards the cylindrical shank, the ring-shaped cell wall regions were redefined after each loading cycle based on the angles that were maintained constant (Fig. 3.2E). This implied the redefinition of the keypoints defining the surface domains. Moreover, because of its different geometry, domain 1 is meshed using a different method than domains 2 through 7. Domains 2 to 7 were meshed using a mapped mesh consisting of quadrilateral elements arranged in obvious rows. Domain 1 is triangular in shape, however. In order to use the same type of element (4 node shell elements) some of the quadrilateral elements had to be rotated which is done by a free mesh generator. This resulted in irregularly arranged shell elements in the pole region (Fig. 3.2C) but did not affect the outcome.

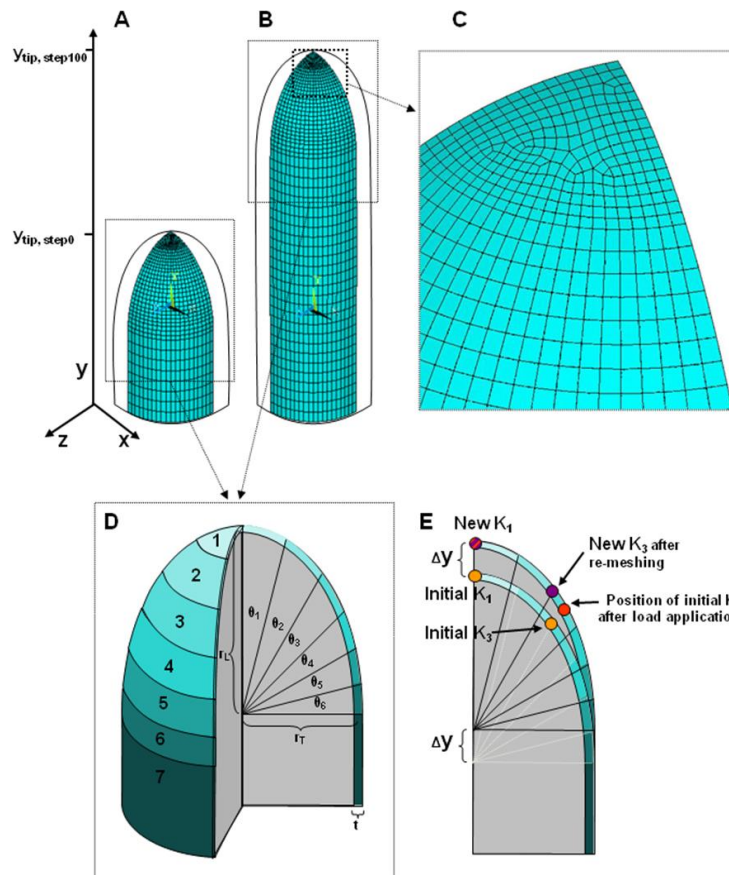


Figure 3.2: Finite element structure of a tip growing cell

Initial structure (A) and structure after 100 load cycles (B, C) in the case of self-similar elongation. Only a quarter of the tube is modeled to exploit radial geometry. The apical region of the cell wall is divided into 6 ring-shaped surface domains defined by the angles θ_1 through θ_6 originating from the center of the ellipse (D). The shape is defined by short radius r_T and a long radius r_L of the ellipse and the thickness t of the shell elements representing the cell wall. Deformation resulting from load application causes the displacement of key points defining surface regions. These are re-defined after re-meshing based on the domain angles θ_i (E).

3.2.3 Validation of the model

One of the objectives of the study was to build a model able to represent perfectly self-similar growth. To assess the quality of the different simulation runs, we devised two quantitative validation methods that allowed us to determine how closely the model behaved to the real cell.

Degree of self-similarity

Tip growing cells grow in a self-similar manner when undisturbed. To determine the degree of self-similarity resulting from the simulations, the shape of the structure after 100 loading cycles was compared with the initial shape that had been established to fit lily pollen. Comparison was done on the 2D profile of the structure. This difference was quantified by calculating the difference between the initial and the final curves describing the cellular profile using the following algorithm. First, elongation of the cell was calculated from the translation of the apical pole in y-direction:

$$\alpha = Y_{\text{tip,step100}} - Y_{\text{tip,step0}}$$

Y-coordinates of the points on the meridian determining the pollen tube profile after the 100th loading cycle was then corrected for tube elongation:

$$Y_{\text{adjusted}} = Y_{\text{step100}} - \alpha$$

Then, the differences for each point on the curve were calculated by:

$$\Delta X = X_{\text{step100}} - X_{\text{step0}}$$

$$\Delta Y = Y_{\text{adjusted}} - Y_{\text{step0}}$$

In parameters described above, "tip" indicates the pole of the cell, "step 0" the original structure, "step 100" the structure after 100 loading cycles. Finally, the deviation of a simulation from the initial shape was calculated by determining the average value for

$$\text{Shape change} = \sqrt{(\Delta X^2 + \Delta Y^2)}$$

for each coordinate of a given profile.

Pattern of surface deformation

Cell wall deformation caused by pressure loading leads to a displacement of material points on the cell wall towards the outside, until the deformed wall becomes part of the non-growing cylindrical shank. The trajectory that a marker on the cellular surface describes during the deformation process reveals the strain pattern on the cellular surface (Rojas et al. in preparation). A finite element model that describes tip growth in realistic manner will have to produce similar surface strain patterns. To test the simulations their capacity to reproduce experimentally observed surface strain patterns, we fixed keypoints on the finite element structure and followed their displacement over a sequence of load cycles.

This method is not trivial in a finite element approach since during re-meshing all nodes are re-defined. A single node can therefore not be followed over multiple load application and remeshing steps. Therefore, the position of a surface marker was extrapolated using the following approach. A point on the original structure was defined as surface marker and its new position after a single load application was recorded. Following re-meshing, the meridional coordinates of the surface marker in the new mesh were defined by identifying the two nearest nodes. The position of these two nodes was recorded and the subsequent position of this point was maintained between the identified nodes for the next loading cycle. The position of the surface marker was approximated by assuming it to be in the center between the two neighboring nodes. This process was repeated with each loading cycle. The positions of the surface markers were then plotted to map their respective displacement trajectories.

For each simulation, displacement trajectories for five surface markers located at varying distances from the pole of the cell were performed. The displacement trajectories were then compared to experimental results (Rojas et al. in preparation) in the same manner as the determination of the degree of self-similarity.

This method introduces an error smaller than a quarter of the size of an element which is between $0.01\ \mu\text{m}$ and $0.05\ \mu\text{m}$ in the apical region. This error can be offset over two iterations. It can be estimated at a maximum of $1\ \mu\text{m}$ in the worst case (highly unlikely) and most probably less than $0.5\ \mu\text{m}$ after 100 iterations.

3.3 Results

3.3.1 Identification of crucial parameters

Theoretical considerations suggest [6] and micro-mechanical data confirm [56, 57] that the cell wall of a tip growing cell has a higher degree of deformability at the apex. However, neither the type of mechanical testing nor the spatial resolution of the micro-indentation approach lends itself to conclude on the precise spatial distribution of extensibility in the apex. Experimental studies [14, 15, 50] corroborate that considerable mechanical support in the cylindrical shank of the cell prevents this region from swelling, but quantitative information is elusive. An objective of our study was to identify the theoretical distribution of material properties within the cell wall of the tip growing cell that is necessary to produce a perfectly self-similar growth pattern. We posed two questions in particular: *a)* How steep does the gradient in cell wall extensibility in meridional direction has to be in order to obtain the initial shape defined by $r_L = 1.5\ r_T$? *b)* Does the cell wall need to possess mechanical anisotropy in its plane? The second question arises from the observation that cellulose microfibrils are present in the apical region of pollen tubes [52, 58] and thus a biochemical basis for putative anisotropy exists.

To simulate extended periods of growth, an internal pressure load was applied repetitively to the finite element structure. The resulting deformation depended on the distribution of material properties in the cell wall, or shell, which were determined by the set of rules detailed above. To identify crucial parameters leading to self-similar growth for the chosen initial shape, we generated an initial set of 64 parameter combinations by modulating three variables: the angles θ_i defining the spatial distribution of annular domains, and multiplication factors m_T and m_L . The angles were varied such that their sum describing domains 1 through 6 equaled 90° (Fig. 3.2D). For m_L we tested the values 1.5, 2, 2.5 and 3, and m_T was tested for the values 0.5, 1, 2, 3 and 4.

For all possible combinations of the explored variables, simulations consisting of 50 iterations were performed. To classify the results of this first set of simulations, we assessed the resulting structures for self-similarity by qualitatively comparing their shapes to that of the initial structure. Analyzing all 64 simulations revealed the following tendencies:

3.3.1.1 Modulation of m_L

Multiplication factor m_L directly influences the steepness of the gradient in cell wall extensibility from the pole towards the shank. When keeping m_T constant, high m_L caused the radius of the elongating tube to progressively decrease after repeated load-cycles, and simultaneously, tube elongation per load cycle was reduced (Fig. 3.3). By contrast, at low values for m_L , this tapering was less pronounced or, depending on m_T , resulted in a widening of the tube and an increased tube elongation. The optimal value of m_L that prevented the tube diameter from changing depended on the other two parameters, but was generally 2 or 2.5.

3.3.1.2 Modulation of m_T

Multiplication factor m_T determines the degree of anisotropy in cell wall extensibility. Increasing the Young's modulus in circumferential direction ($m_T > 1$) resulted in a progressive reduction of the tube radius, whereas if the Young's modulus was lower in circumferential than in meridional direction ($m_T < 1$), tubes widened (Fig. 3.3). Depending on m_L , different values for m_T resulted in a constant tube diameter after repeated load cycles. However for $m_T > 1$ the apex became more prolate (pointed), i.e. the ratio between r_L and r_T became higher, whereas for $m_T < 1$ the apex became oblate (flatter) (Fig. 3.3). Only for $m_T = 1$ did we find combinations of the other parameters that resulted in true self-similarity for the given initial shape. Contrary to m_L , tube elongation per load cycle did only change moderately upon manipulation of m_T .

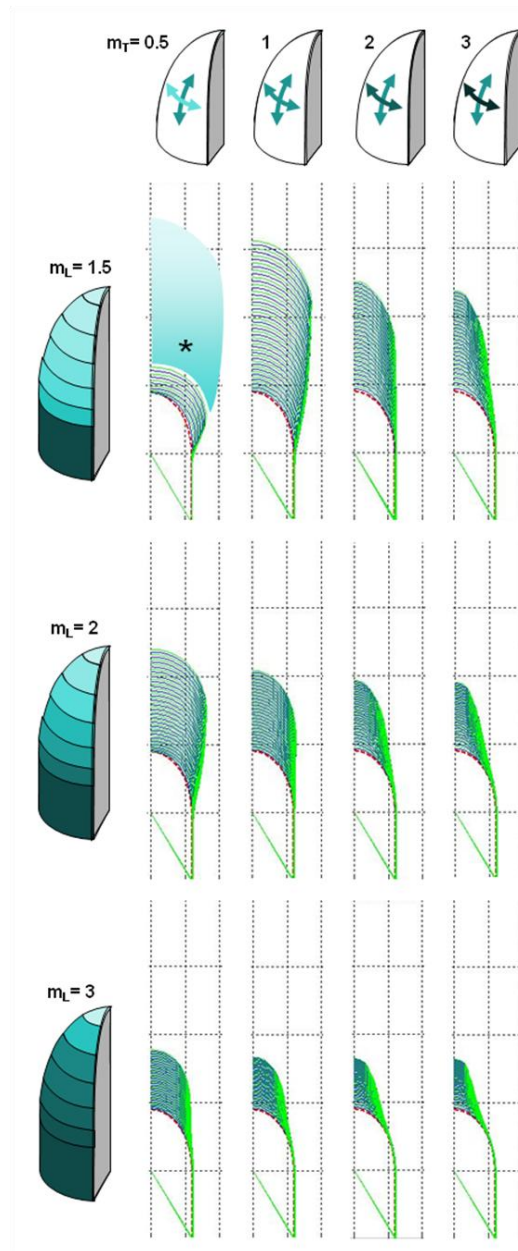


Figure 3.3: Subset of simulations showing the deformation of the cell wall structure after 50 load cycles.

The profile of the original structure is indicated by the red, hatched line. Alternating blue and green lines indicate the results of repeated load cycles. In this subset the domain angles were identical with $\theta_i = 15^\circ$ for $i = 1$ to 6. Various combinations of multiplication factors m_L and m_T demonstrate that for this particular angle distribution, self-similarity was obtained for $m_L = 2$ and $m_T = 1$.

The asterisk indicates an error occurring after the 12th loading cycle due to instability in the structure.

3.3.1.3 Domain angles

The shape of the gradient in cell wall extensibility in meridional direction can be influenced by changing the distribution of domain angles. The variation of domain angles affected both the degree of self-similarity and elongation rate of the pollen tube depending on m_L and m_T . Generally, large domain angles for either domain 1 or domain 2 caused swelling of the tube. In other words, if an increase in Young's modulus set in too far away from the pole of the tube, a widening of the elongating tube resulted.

Analysis of all 64 simulations allowed us to conclude that no self-similarity could be achieved when the cell wall material was anisotropic ($m_T < 1$ or $m_T > 1$) (Fig. 3.3). Therefore, a second set of 32 simulations was performed in which m_T was kept constant (equal to 1 to maintain an isotropic distribution) while m_L and angle distribution were varied in the same ranges as previously, but using smaller increments (Supplemental Table 1 online). Qualitative comparison revealed that overall shallow gradient (Fig. 3.4A) or a large region of low Young's modulus around the pole (Figs. 3.3, 3.4B) caused the expanding tube to swell, whereas steeper gradients (Fig. 3.4C) resulted in a reduction of the tube diameter of the elongating tube. Self-similarity was achieved by a number of different gradients or parameter combinations, all of which were characterized by a moderate but steady increase in Young's modulus from domain 1 to 6, and by a significant jump in Young's modulus from domain 6 to domain 7 (Figs. 3.4D-F). Within this second set of simulations, the 8 parameter combinations with highest degree of self-similarity were selected based on qualitative comparison (Table 3.1) and subjected to further analyses.

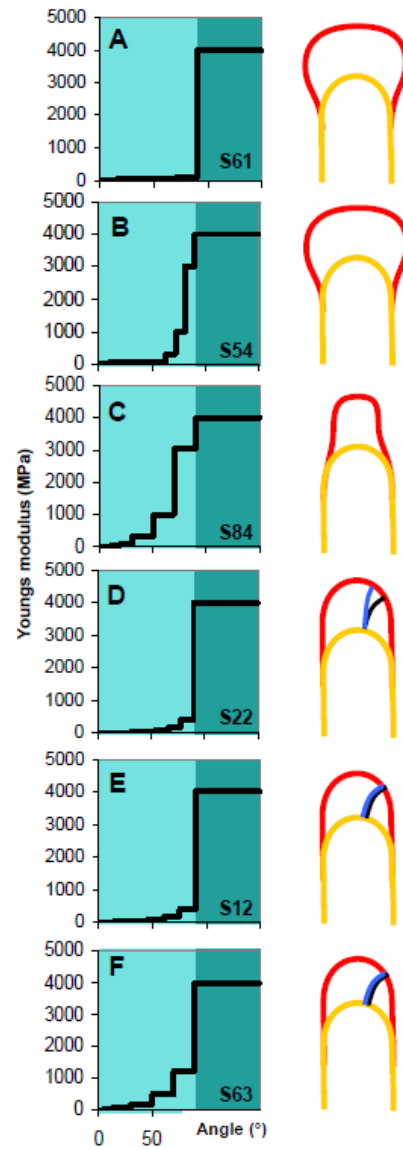


Figure 3.4: Spatial distribution of the Young's modulus in meridional direction of a representative subset of simulations.

For all simulations $m_T = 1$. The apical dome is indicated with light blue, the cylindrical shank with dark blue.

Swelling of the apex could be caused by a shallow gradient (A) or by a large polar domain with low Young's modulus and a late onset in the increase of the modulus (B). Tapering was caused by a steeper gradient (C). Self-similar growth could be achieved by various parameter combinations (D-F), but these did not necessarily produce the surface strain patterns observed in growing pollen tubes (D). The simulations producing a good fit with these strain patterns (E, F) showed a steady, moderate increase in the Young's modulus within the apical dome and a sudden jump at the transition region to the shank.

Tableau 3.1: Supplemental table 1

Simulation	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	θ_5	θ_6	m_L	Shape of profile	Surface deformation
S11	15	15	15	15	15	15	1,5	+	nd
S12	15	15	15	15	15	15	2	0	0
S13	15	15	15	15	15	15	2,5	-	0
S14	15	15	15	15	15	15	3	--	nd
S21	30	12	12	12	12	12	1,5	++	nd
S22	30	12	12	12	12	12	2	0	--
S23	30	12	12	12	12	12	2,5	0	-
S24	30	12	12	12	12	12	3	-	nd
S31	45	9	9	9	9	9	1,5	++	nd
S32	45	9	9	9	9	9	2	+	nd
S33	45	9	9	9	9	9	2,5	+	--
S34	45	9	9	9	9	9	3	0	-
S41	12	30	12	12	12	12	1,5	++	nd
S42	12	30	12	12	12	12	2	+	nd
S43	12	30	12	12	12	12	2,5	0	-
S44	12	30	12	12	12	12	3	0	-
S51	9	45	9	9	9	9	1,5	+++	nd
S52	9	45	9	9	9	9	2	++	nd
S53	9	45	9	9	9	9	2,5	+	nd
S54	9	45	9	9	9	9	3	+	--
S61	5	10	15	20	20	20	1,5	++	nd
S62	5	10	15	20	20	20	2	+	nd
S63	5	10	15	20	20	20	2,5	0	0
S64	5	10	15	20	20	20	3	-	nd
S71	10	15	15	20	15	15	1,5	++	nd
S72	10	15	15	20	15	15	2	0	-
S73	10	15	15	20	15	15	2,5	0	0
S74	10	15	15	20	15	15	3	-	nd
S81	10	10	10	20	20	20	1,5	+	nd
S82	10	10	10	20	20	20	2	0	-
S83	10	10	10	20	20	20	2,5	-	nd
S84	10	10	10	20	20	20	3	--	nd

3.3.2 Quantitative validation of selected parameter combinations

The 8 simulations selected were analyzed quantitatively for their degree of self-similarity (Figs. 3.5A, B) and for their surface strain patterns (Fig. 3.5C, D) as explained in the Validation methods. As expected, the 8 simulations displayed only minor differences in self-similarity (red bars, Fig. 3.5E) but they differed significantly in the quality of their surface strain patterns. The two simulations showing the highest degree of self-similarity with a good strain pattern fit were characterized by a steady increase in Young's modulus beginning close to the pole of the cell, and a significant jump of the modulus between domain 6 and 7 (Simulation S12, Fig. 3.4E; Simulation S63, Fig. 3.4F).

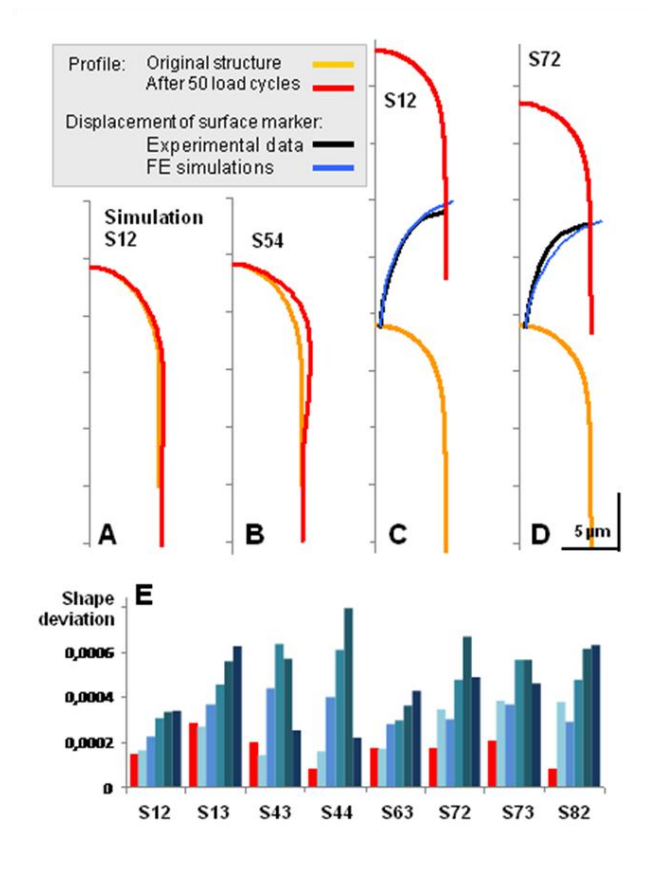


Figure 3.5: Quantitative validation of simulations

(A, B) Self-similarity was assessed quantitatively by comparing the shape profile of a tube after 100 loading cycles (red) with the original structure (orange). Self-similarity was excellent for several simulations (e.g. S12, Fig. 3.5A), but in most others the resulting shape was very different from the original shape (e.g. S54, Fig. 3.5B).

(C, D) Surface deformation was assessed by comparing the paths of surface markers obtained from the simulation (blue) with experimental data obtained from Rojas et al. (in preparation) (black). Only very few simulations showed very good agreement between both curves (e.g. S12, Fig. 3.5C), whereas most did not (e.g. S72, Fig. 3.5D).

(E) Quantitative assessment of the quality of 8 simulations previously selected based on qualitative inspection. The red bars indicate the deviation from self-similarity. The blue bars indicate the deviations in the displacement trajectories of 5 surface markers per simulation.

3.3.3 Effect of geometry and turgor pressure

Once we had established gradients in cell wall mechanical properties leading to self-similar growth, swelling, or tapering, we wanted to assess the effects of cellular geometry and pressure load on the behavior of the model. We generated a new set of simulations based on the mechanical gradients in simulations S12 (self-similar), S51 (swelling) and S14 (tapering) and varied cell size, cell wall thickness and turgor pressure in ranges that were biologically relevant. Within the ranges tested, none of these parameters affected the qualitative nature of the shape change after 50 iterations of the load cycle. Using the mechanical gradient determined for simulation S12, self-similarity was always achieved independently of the thickness of the cell wall (as long the thickness was defined to be identical in all surface domains), the diameter of the tube and the applied turgor pressure (Fig. 3.6). The same was true for swelling and tapering behavior (Fig. 3.6). The only factor affected was the increase in tube length per load cycle. Higher turgor pressure increased this length, lower pressure reduced it in linear manner.

Cell wall thickness was varied within a range that maintained the wall relatively thin compared to the tube diameter, as is typical for plant cells with primary cell walls. An increase in cell wall thickness reduced tube elongation per load cycle in linear manner (Fig. 3.6).

Cell size was altered while maintaining the ratio between the long (r_L) and the short radii (r_T) of the apical ellipse. An increase in tube diameter resulted in a significant increase in tube length per load cycle. Unlike the other two parameters which resulted in a linear response, the increase in tube growth was approximately proportional to r_T^2 (Fig. 3.6). The reason for this phenomenon is likely to be that the deformation depends on the total force exerted on the apical cell wall by the pressure which is linearly dependent on the cross-section of the tube which in turn scales with r_T^2 .

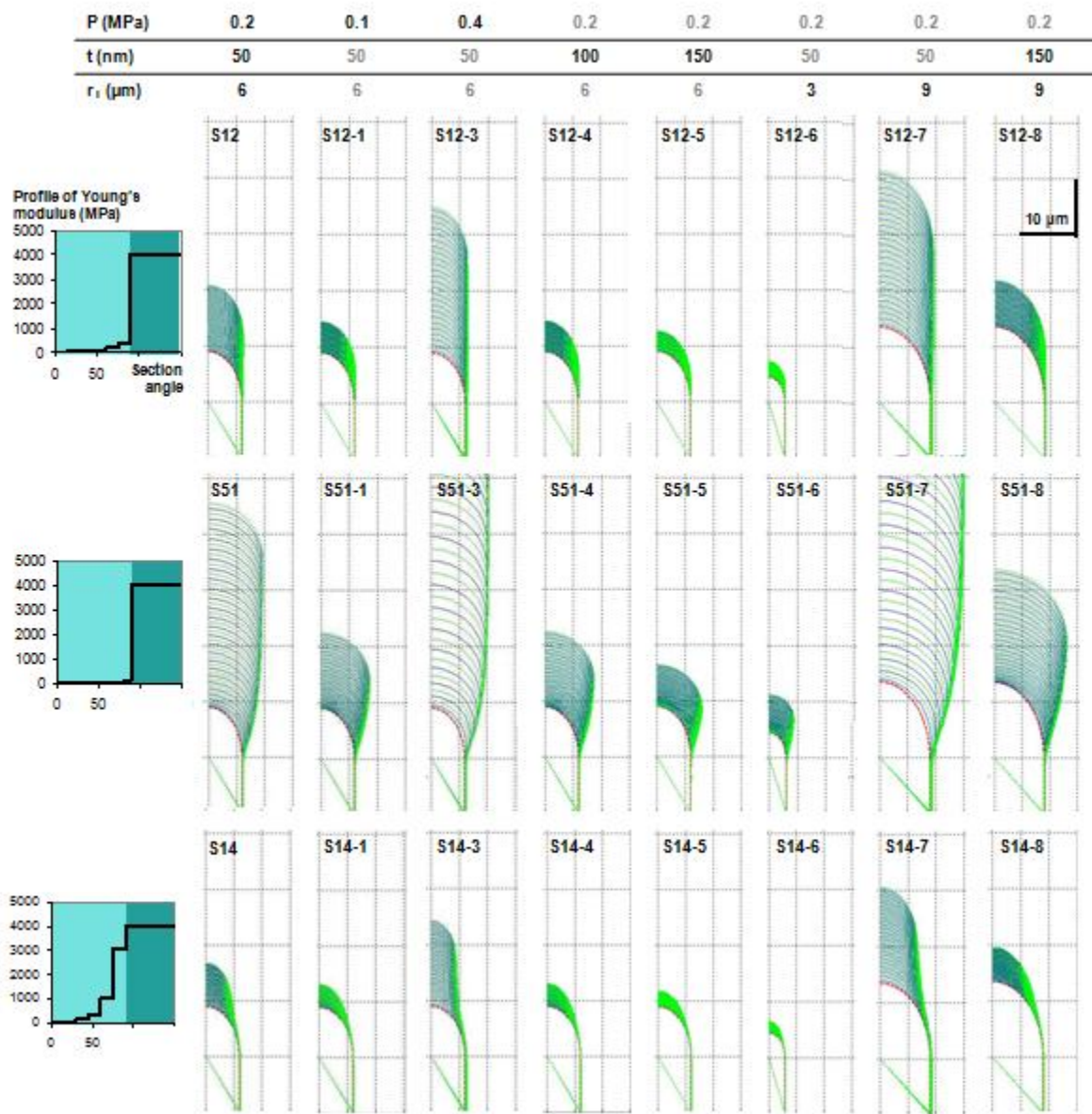


Figure 3.6: Effect of cell wall thickness, turgor pressure and tube diameter on the growth pattern.

The nature of apical deformation (self-similar, swelling, tapering) was not affected by any of the three parameters. The only characteristic altered was the increase in tube length per loading cycle. The profile of the original structure is indicated by the red, hatched line. Alternating blue and green lines indicate the results of repeated load cycles. In all simulations $m_T = 1$.

3.3.4 Comparison with experimentally determined spatial distribution of cell wall components

We wanted to assess whether the steady mechanical gradient in the apical dome of the pollen tube, and the steep increase in Young's modulus in the transition region between the dome and the shank were reflected in the biochemical composition of the cell wall. It is known that pollen tubes display a non-uniform distribution of cell wall components along the longitudinal axis of the cell [6, 14, 50, 51, 59], but quantitative data are lacking. To quantify the precise spatial distribution of cell wall components in lily pollen tubes, a common model species, we labeled cellulose, callose and pectins in *in vitro* grown tubes and we quantified the relative fluorescence intensity along the perimeter of the cell (Fig. 3.7). In accordance with other pollen tube species, our fluorescence micrographs show that the entire lily tube was surrounded by a layer of pectic polysaccharides. In the apical region these pectins were highly methyl-esterified, whereas they were increasingly de-esterified in the more mature region of the cell wall. Cellulose did not change significantly over the length of the tube whereas callose increased slowly beginning in the subapical region. The quantification of the fluorescence micrographs clearly revealed that the most dramatic changes in cell wall biochemistry occurred between 15 and 20 μm meridional distance from the pole of the cell (Fig. 3.7). Given the typical diameter of 18 to 21 μm for lily pollen tubes, this position corresponded exactly to the transition zone between apical dome and cylindrical shank of the cell. Importantly, the configuration of pectins changed from a high to a low degree of methyl-esterification at this location which allows their gelling through calcium ions, a process that rigidifies the extracellular matrix. In particular, the distribution of de-esterified pectins (Fig. 3.7A) showed remarkable similarity to the curve described by the distribution of mechanical properties established by the FE model (Figs. 3.4E, F).

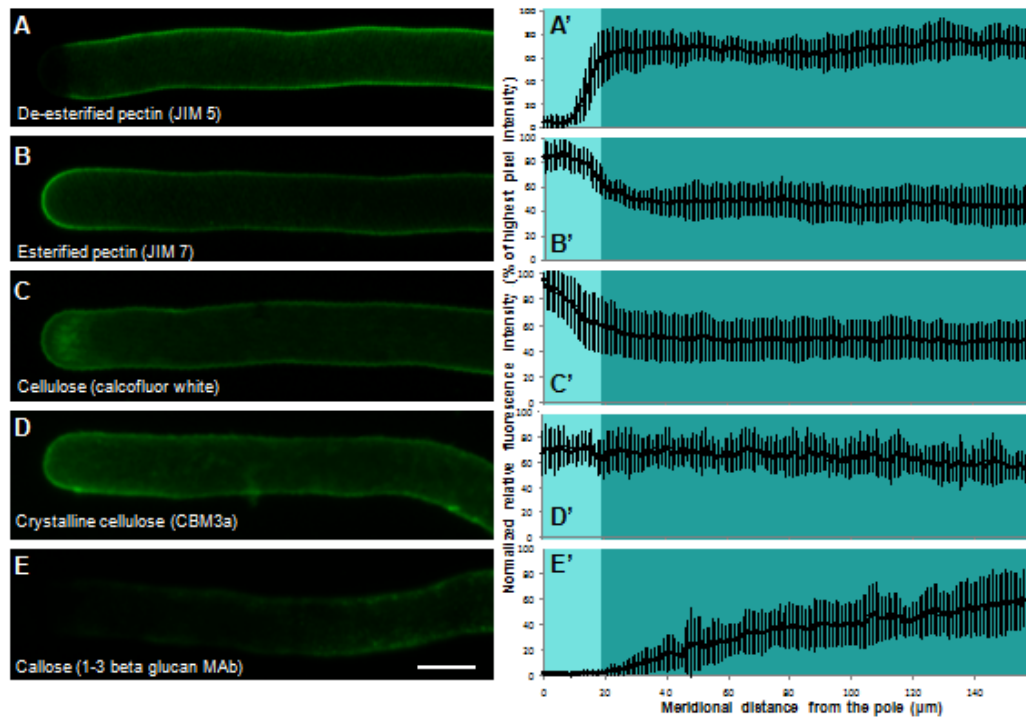


Figure 3.7: Spatial distribution of cell wall components in in vitro growing lily pollen tubes.

Cells were treated with specific antibodies and histochemical stains for pectins with low (A) and high (B) degree of esterification, cellulose (C), crystalline cellulose (D) and callose (D). Graphs show relative fluorescence intensity along the perimeter of the cell, normalized for each tube, and averaged over at least 10 tubes. Vertical bars are standard errors. Light teal indicates the apical dome, dark teal the cylindrical shank. Bar = 20 μm.

3.3.5 Removal of pectin disturbs cell shape determination

Given the excellent correlation between predictions made by the FE model and spatial distribution of pectin label we wanted to test the role of this cell wall component in determining cell shape. To this end, we exposed pre-germinated lily pollen tubes for 15 minutes to pectinase. As a result pollen tubes developed dramatic swellings in the apical region (Fig. 3.8). The virtual absence of fluorescence after immunolabel with JIM5 (Fig. 3.8B) and JIM7 (micrographs completely black, not shown) demonstrated the successful digestion and hence removal of a significant portion of the pectin moiety from the pollen tube cell wall.

An FE simulation carried out using identical mechanical properties (Young's modulus 50 MPa) for all surface domains of the tube confirmed that an absence of a mechanical gradient in the cell wall is predicted to lead to a spherical swelling (Fig. 3.8E).

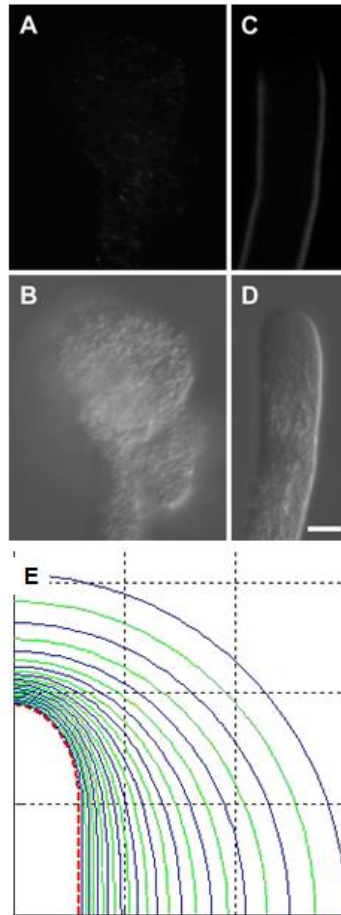


Figure 3.8: Effect of pectin digestion on pollen tube shape

(A-D) Pre-germinated pollen tubes were treated with pectinase for 15 minutes (A,B). Pollen tubes exposed to the enzyme were swollen at the apex (A), whereas untreated tubes elongated in self-similar manner (C). Immunofluorescence label with JIM5 revealed the near absence of pectins with low degree of methyl esterification in enzyme treated samples (B) compared to the control tubes not treated with the enzyme (D). In order to reveal residual label, photographic exposure times for fluorescence label of enzyme treated samples was tripled to 1.5 sec compared with 500 msec for the control sample. Bar = 10 μ m.

(E) Finite element simulation using identical Young's modulus for surface domains 1 through 7 resulted in spherical swelling of the structure. The profile of the original structure is indicated by the red, hatched line. Alternating blue and green lines indicate the results of repeated load cycles.

3.4 Discussion

3.4.1 Mechanics of growth in walled cells

Growth in walled cells is driven by the internal turgor pressure. However, since turgor is a non-vectorial force, spatial control of the growth process relies on the mechanical properties of the cell wall [26, 36]. As predicted [6], micromechanical data revealed a difference in mechanical behavior between the tip of a growing pollen tube and its cylindrical shank [35, 57]. It had been known from other plant species that this gradient is generated by the absence or scarcity of callose [14] and cellulose [15] at the growing apex as well as by the relatively high degree of esterification of the pectin polymers in this region [14, 50]. The pectic polymers are secreted at the apex of the cell in highly methyl esterified form which renders them essentially liquid and consequently the cell wall is easily deformable in this region. During maturation of the wall, pectin methyl esterase, an enzyme that is secreted together with the cell wall polymers, cleaves off the methyl groups. The resulting negative charge of the pectin molecules attracts calcium ions which cause the polymers to gel and thus to form a matrix of much higher stiffness. Although numerous immuno-fluorescence studies on pollen tube have confirmed the general biochemical differences between non-growing shank and growing apex, no quantitative analysis of the spatial distribution within the apical dome had been published. The quantitative data presented here clearly reveal that the most significant changes in the biochemical composition occur in the transition region between apical dome and tubular shank of the cell. These changes were particularly dramatic in the distribution of pectins with low degree of esterification. The striking similarity of their distribution with the profile of the Young's modulus established using the finite element simulations confirms the importance of the change in pectin conformation for the geometry of the elongating tube. The reduction of the pectin moiety in the pollen tube cell wall through the external application of pectinase and the resulting swelling corroborated further that the presence of the mechanical gradient generated by the changing pectin chemistry is crucial for shape determination in this cell.

3.4.2 Information gained from the finite element approach

Our model has allowed us to draw a number of conclusions that reveal important details about the mechanical principles governing tip growth. The highest degree of self-similarity was achieved when representing the cell wall as having isotropic mechanical properties. This finding does not seem to be consistent with observations in root hairs in which a slight meridional stiffening (corresponding to $m_T < 1$) provides the best explanation for tip elongation [45]. However, unlike the lily pollen tube analyzed here, the shape of a root hair is somewhat oblate with a region of maximal curvature at an annular region around the pole of the cell. Consequently the mechanics of the growth process in this cell type may be slightly different. Furthermore, the increments in m_T tested here were too large to pick up a subtle anisotropy that could putatively provide an even better fit than those simulations we identified in the present set. It remains that the result of our approximate approach is consistent with structural observations. Putative anisotropy would have to derive from a preferential orientation of microfibrils. Cellulose orientation has unfortunately not been determined in the apical dome of lily pollen tubes although our immunolabel shows that cellulose is clearly present in this region. However, in other plant species, microfibrils seem to be short and oriented randomly in the apical regions of the pollen tube [52, 53] indicating that they do not generate anisotropy in the cell wall mechanical properties of the tube apex.

More than one parameter combination tested here produced growth patterns with acceptable degree of self-similarity, but not all of them necessarily generated trajectory maps of surface markers that agreed with experimental data. Agreement was obtained for steady mechanical gradients in the apical dome that were followed by sudden increases in Young's modulus in the transition region to the shank. It is, therefore, important to recognize that testing for similarity between the predicted and experimentally observed final shape of a growing structure is not sufficient to identify the correct mechanical profile. Our second validation method, the comparison with surface strain patterns, was therefore crucial to determine the fit of the model with the living cell.

Our model showed that swelling of the tube was achieved when the gradient in Young's modulus along the longitudinal axis was not sufficiently steep, or when the increase in Young's modulus began too far from the pole. This is consistent with experimental data showing that enzymatic

treatments with cellulase, an enzyme that digests cellulose microfibrils, result in a swelling of the tube apex [15]. The FE simulations suggest that the effect is mediated by a reduction in the Young's modulus in the apical dome. This means that, although they may not confer anisotropy to the pollen tube apex due to their random orientation, the presence of cellulose microfibrils nevertheless seems to contribute to tensile resistance of the cell wall in this region. Similarly, the FE model may help to understand other phenomena that occur upon manipulation of the mechanical properties of the pollen tube cell wall such as those caused by the transient expression of pectin methyl esterase inhibitor, by the overexpression of pectin methyl esterase [60] or by exposure to externally applied enzyme [50, 61]. Ongoing controversies about the cellular features controlling growth dynamics in these cells [20, 62] may also gain from this engineering approach to cell biology.

3.4.3 Impact of a mechanical model of tip growth

An accessible mathematical model will draw the attention to the fact that any kind of change in growth behavior is ultimately mediated by affecting cell mechanics. Recognizing this should complement approaches that hitherto focused purely on intracellular processes such as signaling events. Pollen tube swelling [25, 48, 49, 63] or tapering [49] resulting from manipulations in the signaling machinery of the cell can only be completely understood if the biophysical mechanism that translates biochemical and signaling processes into particular cellular phenotypes are included in the interpretation of experimental data.

A significant advantage of the finite element approach is the fact that the model can easily be adapted to other tip growing cell types. Species-specific differences in the spatial distribution of biochemical components can easily be accommodated rendering the model extremely versatile. Variations in geometry such as tube diameter and shape of the apex can be modified through modulating a single parameter, respectively. Hence, adaptation to the small tubes of *Arabidopsis* (typical diameter of 6 μm) or to the more tapered tip of fungal hyphae is straightforward. The gradient of mechanical properties and the degree of anisotropy can be altered locally or globally and the model can be equipped with a time-dependent component by using viscoelastic instead of purely elastic properties.

3.4.4 Limitations of the finite element approach

Pollen tube growth is a very rapid process and the deformation of the cell wall involved in the process is extremely large compared with the size of the initial structure. One of the drawbacks of the finite element approach in the context of large deformation was the necessity of operating with cyclic iterations which lead to a non-continuous growth. During each iterative step the structure was re-created, and, depending on the number of nodes, the shape of the subsequent structure could display small differences compared with the previous structure (e.g. anchor points of the geometry could change). However, the advantage of being able to easily change the parameters defining the mesh, such as the number and size of the elements in transversal as longitudinal direction, leads to a more refined geometry which compensates for the small errors introduced by this limitation. Those errors are much smaller than the size of one element, which is $0.5\text{ }\mu\text{m}$ in the distal part.

Another potential shortcoming of our finite element approach was the spatial distribution of material properties in discrete domains. As a result, there were significant and instant changes in the elastic modulus between the successive, ring-shaped cell wall domains which could potentially introduce local stresses in the cell wall. However, even after 100 iterations, the resulting structures always had smooth curvatures. This suggests that these local stresses had negligible effects on the final outcome. Further confirmation of the validity of our model can be derived from comparison with other mathematical approaches. Our profiles for the Young's modulus look remarkably similar to those obtained for spatial distribution of mechanical properties in root hairs that had been generated inferring from a comparison of the strain rates and wall stresses in this cell type [45]. Therefore, despite the discrete changes in mechanical properties, our approximate approach was sufficient to yield excellent qualitative fit with experimental data.

3.4.5 Potential of the finite element approach for modeling complex geometries

Previous attempts to model tip growth were mostly restricted to geometric interpretations [1] or purely mathematical equations [2]. However, although they may be elegant in their simplicity, their biological relevance is limited due to the low number of parameters. For instance, cell wall thickness or anisotropy are not taken into account in these models. More recent models include the Vesicle Supply Center model for hyphal growth [44], hyphal growth models based on linear elastic [4] and non-linear elastic membrane theory [47], a model for root hair elongation based on viscoplasticity theory [5], and an approach based on a representation of the cell wall as viscous fluid shell [34]. However, all of these models are limited in their versatility to the simple axisymmetric geometry of the tip growing cell, even though they can explain variations in shape that are based on changes in the tube diameter or the pointedness of the apex.

The most important advantage of the finite element approach consists in its potential to cope with the complexity of cellular geometries and mechanical properties encountered in nature. In most other models the thickness of the cell wall is only indirectly considered, whereas in the FE model this variable can be manipulated either globally or - with minor modifications - locally, to accommodate phenomena such as the temporal variation in the thickness of the apical cell wall observed in lily and tobacco pollen tubes [22, 23]. Remarkably, this experimentally observed change in cell wall thickness is associated with temporary growth arrest or periodic temporal changes in the growth rate. Our model has therefore the potential to explain these phenomena at the mechanical level and thus provides a tool to test conceptual models explaining processes such as those displayed during oscillatory growth [19, 20]. Potential integration with mechanical models operating at the scale of individual cell wall polymers [2] offers another intriguing perspective.

More importantly, contrary to other models, the FE approach will enable us to model changes in the growth pattern that abandon axisymmetric geometry, such as a change in growth direction. This is a phenomenon that is very typical for fungal hyphae and pollen tubes as these cells are able to follow chemical gradients [64]. Asymmetric and other complex geometric shapes can be constructed in FE analysis based on 3D data obtained from confocal imaging or other 3D

reconstruction techniques. Contrary to earlier models for tip growth, adaptation of the FE model is therefore not limited to tip growth. All the complex cellular shapes that can be observed in plant tissues are likely based on the non-uniform distribution of cell wall components and cell wall dimensions, and, as a consequence, the Young's modulus. Shapes such as those of jigsaw-puzzle shaped epidermis cells could be modeled easily exploiting the discrete approach we used here that is based on the division of the cellular surface into domains with varying mechanical properties. The ability of the FE method to take a complex problem or structure whose solution may be difficult if not impossible to obtain, and decompose it into smaller elements allows us to construct simple approximations of the solution that might provide important information on the mechanics of expansive cellular growth in all cell types with walls.

3.5 Experimental procedures

Plant material and pollen culture

Lilium orientalis pollen was obtained from a local flower shop. Pollen was dehydrated for 24 h and then stored at -80°C for future use. Pollen grains were hydrated for 30 min. Hydrated pollen was incubated at 25°C for 2 to 3 h under continuous shaking in a 25 mL Erlenmeyer flask containing 3 mL of growth medium made of $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ H}_3\text{BO}_3$, $300\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ KNO}_3$, $200\text{ mg mL}^{-1}\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sucrose.

Pollen tubes exposed to pectinase were grown in regular growth medium for 3 hours 45 minutes before addition of 8 mg/ml pectinase (Fluka).

Fluorescence label

All steps were carried out in the microwave oven operating at 150 W under 21 inches of Hg vacuum at a controlled temperature of $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. For fluorescence labeling, pollen tubes were filtered and subsequently fixed in 3.5% freshly prepared formaldehyde in Pipes buffer (50 mM Pipes, 1mM EGTA, 0.5 mM MgCl_2 , pH 6.9) for 40 seconds followed by 3 washes in Pipes buffer. For immuno-labeling pollen tubes were then washed 3 times with PBS buffer (135 mM

NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3) with 3.5% bovine serum albumine (BSA). All subsequent washes were done with PBS buffer with 3.5% BSA for 40 seconds. All antibodies were diluted in PBS buffer with 3.5% BSA. 10 min incubations with the primary antibody were followed by wash steps and 10 minute incubations with 1% IgG-Alexa Fluor 594 anti-rat secondary antibody (Molecular Probes). Controls were performed by omitting incubation with the primary or the secondary antibody. Pectin label was performed with primary antibodies JIM5 (pectin with low degree of esterification) and JIM7 (pectin with high degree of esterification). Label for crystalline cellulose was done with CBM3a (Cellulose Binding Module 3a) followed by monoclonal mouse-anti-polyhistidine antibody (Sigma). These primary antibodies were obtained from Dr. Paul Knox, University of Leeds, United Kingdom. Callose label was done with monoclonal IgG antibody to (1→3)- β -Glucan (Biosupplies Australia Pty Ltd). Cellulose (crystalline and amorphous) was also labeled with 1 mg mL⁻¹ calcofluor following fixation. All samples were mounted on glass slides in a drop of citifluor (Electron Microscopy Sciences) for microscopical observation.

Fluorescence microscopy

Observation of samples was done with a Zeiss Imager-Z1 microscope equipped with structured illumination microscopy (ApoTome Axio Imager), a Zeiss AxioCam MRm Rev.2 camera and AxioVision Release 4.5 software. Observations were made using a filter set with excitation BP450-490 nm, beamsplitter FT 510 nm and emission BP 515-565 nm for calcofluor labeling and a filter set with excitation BP 390/22 nm, beamsplitter FT 420 nm and emission BP 460/50 nm for Alexa fluor 594 detection. Exposure time was adjusted for all images so that only one or two pixels were saturated when not using the ApoTome Imager. ApoTome Imager was then inserted and z-stack images of 1 μ m interval of pollen tubes were taken and image reconstruction was performed using the AxioVision software by the projection of the stacks.

Image processing and fluorescence quantification

Only z-projections were used for fluorescence quantification. ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008) software was used for fluorescence quantification of cell wall stained components. Pixel intensity was measured along the periphery of each pollen tube, beginning from the pole. Values for fluorescence intensity were normalized to the highest fluorescence value for individual tubes before averaging ($n > 10$ for each sample). Distances on the x-axis of the graphs represent the meridional distance from the pole of the cell.

Acknowledgements

This project was supported by a grant from the *Fonds de recherche sur la nature et les technologies du Québec* to C.E.A., I.V. and A.G., and by an Ann Oaks scholarship from the Canadian Society of Plant Physiologists to Y.C. We thank Jacques Dumais and Enrique Rojas for making their unpublished data available to us.

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre de discussion contient de nouvelles pistes de réflexions, en complément à la discussion présentée dans l'article scientifique (Chapitre 3).

Tout d'abord, bien que la combinaison trouvée pour le module d'Young soit très proche des constatations expérimentales, il existe quand même certaines différences. Il convient donc de réfléchir à un moyen d'obtenir la simulation parfaite concernant nos critères de validation soit un apex gardant strictement la même forme et des trajectoires de surface suivant parfaitement les résultats dont on dispose. On peut observer sur plusieurs simulations que le tube semble converger vers une certaine largeur si l'on effectue suffisamment d'itérations. Il est possible que ce soit le cas pour un très grand nombre de combinaisons. Le modèle parvient donc dans la majorité des cas à retrouver une stabilité. Dans ces simulations, les valeurs utilisées pour m_L et m_T sont, à l'apex, trop faibles ou trop élevées pour favoriser une croissance régulière. La géométrie évoluant, les efforts mis en jeu sur chaque section changent pour finalement aboutir à un système qui s'équilibre. Ce point montre que la modélisation parvient à s'adapter à des valeurs ne convenant pas et il pourrait être envisagé de se servir de cette remarque dans la recherche d'un gradient de module d'Young représentatif. En effet, si chaque combinaison est destinée à se stabiliser à une largeur fixe, il devrait être possible d'obtenir une relation entre les paramètres. L'étude de cette relation permettrait alors de déterminer les conditions représentatives afin d'obtenir la croissance voulue.

La paroi cellulaire, constituée d'un grand nombre de matériaux différents, pourrait être modélisée en prenant en compte cette hétérogénéité dans sa composition. Bien que ce raffinement demande un grand nombre de modifications sur le programme actuel et que les temps de calculs seraient énormément augmentés, il permettrait d'obtenir un haut degré de réalisme du modèle du point de vue biologique. Représenter l'ensemble de ces matériaux reviendrait à décomposer la paroi en une multitude de sections possédant chacune leurs propriétés et comportements. Un tel modèle, représentant les différents matériaux de la paroi du tube a déjà été développée sous Fortran [65]. Dans ce programme nommé GenWall, les parois cellulaires se composent de deux polymères qui sont eux-mêmes représentés à l'aide d'un grand nombre d'éléments liés mécaniquement entre eux. L'utilisateur se doit d'indiquer les propriétés mécaniques des deux polymères ainsi que leur

répartition. La méthodologie présentée pourrait donc servir de base à l'intégration de cette amélioration dans le modèle éléments finis.

Les études biologiques montrent que la cellulose est organisée en spirale dans la paroi du tube pollinique. Il existe donc, à l'intérieur de la partie cylindrique, une anisotropie de la paroi cellulaire. Cet arrangement pourrait être utilisé comme renforcement de la paroi contre les forces externes s'exerçant axialement [66]. Cette organisation particulière de la cellulose pourrait être ajoutée au modèle en modélisant directement les fibres de cellulose et en les connectant avec les autres matériaux de la paroi cellulaire (pectines et callose en particulier). Cette complexité accrue du modèle risquerait à nouveau d'augmenter le temps de calcul.

Tel que discuté dans l'article, le tube pollinique a dans certains cas particuliers, la propriété de changer de forme pour entraîner un gonflement ou un changement de direction. Un des objectifs de l'outil de modélisation est de pouvoir simuler ces modifications observées expérimentalement. Pour les cas du gonflement ou de la diminution de rayon, certaines simulations ont déjà permis d'identifier les paramètres produisant ces formes (Fig 3.4). Il serait ensuite intéressant de comparer la distribution spatiale expérimentale des composantes biochimiques de la paroi à celle obtenue des simulations. Le cas de changement de direction demanderait des modifications plus importantes du modèle, car les simulations actuelles du tube, qui sont axisymétriques, ne permettraient pas la mise en place de cette déviation entraînant la perte de cette symétrie. La simulation de ce cas requerrait le développement d'un nouveau modèle tridimensionnel complet (et non plus seulement un quart de type axisymétrique). Il faudrait ensuite appliquer des propriétés mécaniques différentes selon le domaine en suivant les conclusions précédentes (le tube complet pourra être décomposé en quatre parties ou plus selon les besoins). Par exemple, l'utilisation de propriétés de gonflement d'un côté et de rétrécissement de l'autre devrait provoquer une déviation de la direction de croissance.

Enfin, il est important de noter que la modélisation par éléments finis permet de répondre à de nombreuses questions, que ce soit d'un point de vue scientifique ou biologique. En effet, elle permet de mieux comprendre les caractéristiques mécaniques de la croissance et par la même occasion de les relier aux observations expérimentales. Ces conjectures passent par la compréhension de la croissance apicale mais aussi par l'influence de la pression turgescence ou encore la possibilité d'expliquer le rôle de certains matériaux de la paroi en liant observations des

simulations et connaissances de la composition du tube pollinique. Il apparait donc crucial que la biologie s'appuie sur ces modèles pour comprendre les résultats expérimentaux. De la même manière, il est tout aussi important que la mécanique se base sur la biologie pour la construction des programmes de modélisation. Les deux disciplines sont donc amenées à travailler de concert.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise avait pour but dans un premier temps de créer un modèle fonctionnel de la croissance du tube pollinique afin de pouvoir étudier l'influence des différents paramètres intervenant dans l'évolution de la paroi. Le modèle développé, de type éléments finis, permet de modifier simplement les modules d'Young, la géométrie ou encore les lois de comportement des matériaux composant le tube. Un gradient de rigidité a été mis en place pour mieux représenter les observations expérimentales et ce, à l'aide de deux paramètres (m_L et m_T) ainsi que d'une distribution d'angle le long du tube permettant sa segmentation longitudinale pour les propriétés mécaniques.

La validation du modèle développé a ensuite été effectuée à l'aide de deux méthodes. La première s'est principalement penchée sur la capacité à représenter une croissance unidirectionnelle du tube. Elle a donc simplement comparé les formes initiales et finales du tube afin de vérifier que celles-ci étaient bien identiques, ce qui n'était pas forcément le cas avec toutes les combinaisons de gradient du module d'Young effectuées. La deuxième méthode a comparé des résultats expérimentaux représentant les déplacements à la surface du tube pollinique avec ceux obtenus des simulations de croissance du tube pollinique. L'ensemble de ces deux méthodes a permis d'obtenir une validation suffisante de la modélisation et a mené au choix d'une combinaison de paramètres mécaniques représentant au mieux la croissance normale, i.e. une croissance unidirectionnelle et dont l'apex conserve la même forme.

Basé sur les résultats de simulation obtenus, une première conclusion est apparue, l'isotropie des matériaux composant le tube (comparativement à l'orthotropie) permet, dans la plupart des cas, de mieux représenter la croissance «self similar» du tube pollinique. Ceci, en plus de simplifier les résultats, permet aussi de se rapprocher du comportement réel du tube dans l'apex. En effet, la pectine possède des propriétés isotropes. Cependant, il est évident que l'isotropie ne pourra jamais avoir la représentation la plus juste vis-à-vis de l'anisotropie qui procure plus de degrés de liberté au modèle. Il a ensuite été constaté que les deux paramètres influençant le module d'Young (m_L et m_T) changeaient radicalement l'évolution de la croissance si l'on s'éloignait des valeurs donnant le résultat voulu (soit $m_L=2$ et $m_T=1$). De manière générale, une réduction de ceux-ci (baisse des valeurs) entraînait une augmentation du diamètre du tube au fur et à mesure de la simulation et inversement. Le gradient du module d'Young est donc fortement responsable

de la manière dont croît la cellule comme il a déjà été prouvé biologiquement. De plus, l'effet de la pression de turgescence et de l'épaisseur de la paroi cellulaire a aussi pu être testé. Dans les deux cas, ces deux paramètres provoquaient une variation de la quantité de croissance pendant un pas. Changer le diamètre du tube en gardant le ratio entre le grand côté de l'ellipse et le petit côté constant provoquait là aussi une augmentation de la croissance entre chaque pas. Les seuls paramètres influençant la forme du tube sont donc ceux faisant varier le module d'Young.

Plusieurs questions viennent à se poser quand au réalisme du modèle et à sa capacité à reproduire la croissance du tube pollinique. En réalité, les hypothèses mécaniques utilisées ici peuvent être complexifiées afin d'augmenter le taux de réalisme.

Tout modèle est par définition une approximation. Afin de se rendre plus près de la réalité biologique, on pourrait modifier le modèle existant en incluant les éléments suivants :

1. Utiliser un comportement viscoplastique comme dans le modèle de J. Dumais [5]. Ce type d'amélioration intègre la notion de déformation de la cellule en fonction du temps. Dans le modèle développé, des éléments élastiques ont été utilisés malgré que le tube se comporte en réalité de manière viscoplastique. La principale difficulté d'intégration d'un comportement viscoplastique résiderait dans la connaissance des paramètres de la loi de comportement pour les composantes de la paroi du tube pollinique. Sous ANSYS, la modélisation passe par l'utilisation de séries de Prony comme dans le modèle sur les foies de porcs de Zhou et al [67]. Ce modèle bien que n'ayant pas de lien avec le tube pollinique est un bon exemple de l'utilisation de propriétés viscoplastiques pour la modélisation de la déformation cellulaire via aspiration par micropipette.
2. Ajouter la représentation du cytosquelette. La modélisation du cytosquelette serait assez complexe vu le nombre élevé de choix de modélisation à faire, que ce soit sur l'emplacement, la taille ou encore les propriétés mécaniques des différents éléments constituant le cytosquelette. De telles décisions se révèlent être très importantes pour le comportement futur du tube pollinique car, comme il a déjà été souligné, ces aspects ont une forte influence sur les propriétés mécaniques globales de la cellule. On peut par exemple distinguer le cas des microtubules qui tendent à orienter la croissance et à

rigidifier la paroi dans une seule direction [9]. Aussi, le rôle mécanique du cytosquelette est encore mal compris dans le tube pollinique. Dans les cellules animales (ex. fibroblastes), la polymérisation des filaments d'actine est responsable de la migration des cellules et donc les filaments d'actines exercent clairement un rôle mécanique. Ce rôle n'a cependant pas été prouvé dans le cas des tubes polliniques.

3. Un des phénomènes biologiques s'opérant dans la croissance du tube est le transport de matériaux le long de la cellule pour assemblage à la paroi de l'apex. En effet, afin de croître, la paroi doit disposer de nouveau matériel pour conserver une épaisseur et des propriétés plus ou moins constantes. Le cytosquelette est l'élément qui assure cette tâche mais il pourrait être intéressant de représenter ce transport et cet ajout de matériel sans pour autant devoir modéliser le cytosquelette comme tel. Dans la modélisation actuelle, le fait de reconstruire à chaque étape le modèle permet de simuler ce phénomène, car les propriétés mécaniques sont en quelque sorte réinitialisées à chaque pas de croissance. Cependant, modéliser l'ajout de nouveau matériel sous une forme plus réaliste permettrait d'améliorer l'ensemble du travail.
4. Le point le plus important et le plus intéressant du modèle est sa possibilité de générer relativement facilement des formes complexes. Réussir à représenter les croissances non régulières (voir Discussion générale) serait donc l'aboutissement du travail effectué jusqu'à présent.

L'ensemble de ce projet apporte à la fois une innovation sur la manière de modéliser la croissance du tube pollinique mais aussi de nombreux résultats concordant avec les observations expérimentales. L'ajout futur des recommandations détaillées ci-haut apporterait une part de réalisme très intéressante menant à un modèle réaliste et fonctionnel du processus de croissance du tube pollinique et de ses anomalies potentielles, qui permettrait de dégager des connaissances d'intérêt pour le domaine biologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Da Riva Ricci, D., Kendrick, B., *Computer Modelling of hyphal tip growth in fungi*. Canadian Journal of Botany, 1972. **50**(12): p. 2455–2462.
2. Denet, B., *Numerical simulation of cellular tip Growth*. Physical Review Letters, 1996. **53**(1): p. 986-992.
3. Bartnicki-Garcia, S., Gierz, G., *A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the Vesicle Supply Center concept*. Journal of Theoretical Biology, 2000. **208**(2): p. 151-164.
4. Goriely, A., Tabor, M., *Self-Similar Tip Growth in Filamentary Organisms*. Physical Review Letters, 2003. **90**(10): p. 108101.
5. Dumais, J., Shaw, S., Steele, C.R., Long, S.R., Ray, P.M., *An anisotropic-viscoplastic model of plant cell morphogenesis by tip growth*. International Journal of Development Biology, 2006. **50**: p. 209-222.
6. Geitmann, A., Steer, M., *The Architecture and Properties of the Pollen Tube CellWall*, in *Plant Cell Monogr.* 2006. p. 177-200.
7. Geitmann, A., Dumais, J., *Not-So-Tip-Growth*. Plant Signaling & Behavior, 2009. **4**(2).
8. Geitmann, A., Emons, A., *The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth*. Journal of Microscopy, 2000. **198**: p. 218-245.
9. Gossot, O., Geitmann, A., *Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton*. Planta, 2007. **226**: p. 405-416.
10. Bove, J., Vaillancourt, B., Kroeger, J., Hepler, P.K., Wiseman, P.W., Geitmann, A., *Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)*. Plant Physiology, 2008. **147**: p. 1646-1658.

11. Kroeger, J.H., Bou Daher, F., Grant, M., Geitmann, A., *Microfilament orientation constrains vesicle flow and spatial distribution in growing pollen tubes*. Biophysical Journal, 2009. **97**: p. 1822-1831.
12. Vidali, L., McKenna, S., Hepler, P.K., *Actin polymerization is essential for pollen tube growth*. Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**: p. 2534-2545.
13. Money, N.P, *Wishful Thinking of Turgor Revisited: The Mechanics of Fungal Growth*. Fungal Genetics and Biology, 1997. **21**: p. 173–187.
14. Parre, E., Geitmann, A., *More Than a Leak Sealant. The Mechanical Properties of Callose in Pollen Tubes*. Plant Physiology, 2005. **137**: p. 274-286.
15. Aouar, L., Chebli, Y., Geitmann, A., *Morphogenesis of complex plant cell shapes - the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes*. Sexual Plant Reproduction, 2010. **23**: p. 15-27.
16. Ortega, J., *A quantitative biophysical perspective of expensive growth for cells with walls*. Recent Res. Devel. Biophys, 2004. **3**.
17. Schopfer, P., *Biomechanics of plant growth*. Am J Bot, 2006. **93**: p. 1415-1425.
18. Geitmann, A., Cresti, M., Heat, I.B., *Cell biology of plant and fungal tip growth*. NATO Science Series, ed. I. press. 2001, Amsterdam.
19. Chebli, Y., Geitmann, A., *Mechanical Principles Governing Pollen Tube Growth*, in *Functional Plant Science and Biotechnology*, G.S. Books, Editor. 2007. p. 232-245.
20. Zonia, L., Munnik, T., *Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics*. Trends Plant Sci., 2009. **14**: p. 318-327.
21. Benkert, R., Obermeyer, G., Bentrup FW, *The turgor pressure of growing lily pollen tubes*, in *Protoplasma*. 1997. p. 1-8.
22. Zerzour, R., Kroeger, J., Geitmann, A., *Micro-indentation reveals spatially confined dynamic changes in mechanical cell wall properties during plant cell morphogenesis*. Developmental Biology, 2009. **334**(2): p. 437-446.

23. McKenna, S.T., Kunkel, J.G., Bosch, M., Rounds, C.M., Vidali, L., Winship, L.J., Hepler, P.K., *Exocytosis precedes and predicts the increase in growth in oscillating pollen tubes*. Plant Cell, 2009. **21**: p. 3026-3040.
24. Kroeger, J.H., Geitmann, A., Grant, M., *Model for calcium dependent oscillatory growth in pollen tubes*. Journal of Theoretical Biology, 2008. **253**(2): p. 363-374.
25. Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, S., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C., Chua, N.-H., *Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth*. J. Cell Biol., 1999. **145**: p. 317-330.
26. Geitmann, A., Ortega, J., *Mechanics and modeling of plant cell growth*. Trends in Plant Science, 2009. **14**: p. 467-478.
27. Lockhart, J.A., *An analysis of irreversible plant cell elongation*. Journal of Theoretical Biology, 1965. **8**: p. 264-275.
28. Passioura, J.B, Fry, S.C., *Turgor and cell expansion: beyond the Lockhart equation*. Australian Journal of Plant Physiology, 1992. **19**: p. 565-576.
29. Wei, C, Lintilhac, P., *Loss of stability – a new model for stress relaxation in plant cell walls*. Journal of Theoretical Biology, 2003. **224**: p. 305-312.
30. Dyson, R.J., Jensen, O.E., *A fibre-reinforced fluid model of anisotropic plant cell growth*. J. Fluid Mech, 2010. **Under consideration for publication**.
31. Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., Gierz, G., *Computer simulation of morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth*. Protoplasma, 1989. **153**: p. 46-57.
32. Tindermans, S.H., Kern, N., Mulder, B.M., *The diffusive vesicle supply centre model for tip growth in fungal hyphae*. Journal of Theoretical Biology, 2006. **238**: p. 937-948.
33. Bernal, R., Rojas, E., Dumais, J., *The mechanics of tip growth morphogenesis : what we have learned from rubber balloons*. 2007.
34. Campàs, O., Mahadevan, L., *Shape and dynamics of tip-growing cells*. Current Biology, 2009. **19**: p. 2102-2107.

35. Bolduc, J.F., Lewis, L., Aubin, C.É., Geitmann, A., *Finite-element analysis of geometrical factors in micro-indentation of pollen tubes*. Biomechan Model Mechanobiol, 2006. **5**(227-236).
36. Cosgrove, D.J., *Growth of the plant cell wall*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2005. **6**: p. 850-861.
37. Wasteneys, G.O., Galway, M.E., *Remodeling the cytoskeleton for growth and form: An overview with some new views*. Annual Review of Plant Biology, 2003. **54**: p. 691-722.
38. Mathur, J., *Cell shape development in plants*. Trends Plant Sci., 2004. **9**: p. 583-590.
39. Mathur, J., *Local interactions shape plant cells*. Curr. Opin. Cell Biol., 2006. **18**: p. 40-46.
40. Smith, L.G., Oppenheimer, D., *Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2005. **21**: p. 271-295.
41. Baskin, T., *Anisotropic expansion of the plant cell wall*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2005. **21**: p. 203-222.
42. Hamant, O., Heisler, M., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E., Couder, Y., Traas, J., *Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis*. Science, 2008. **322**: p. 1650-1655.
43. Bartnicki-Garcia, S., *Hyphal tip growth: outstanding questions*. Molecular biology of fungal development, 2002: p. 29-58.
44. Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C., Gierz, G., Lopez-Franco, R., Lu, H., *Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor*. Biophys. J., 2000. **79**: p. 2382-2390.
45. Dumais, J., Long, S., Shaw, S.L., *The mechanics of surface expansion anisotropy in Medicago truncatula root hairs*. Plant Physiol., 2004. **136**: p. 3266-3275.
46. Goriely, A., Tabor, M., *Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes*. J. Theor. Biol., 2003. **222**: p. 211-218.
47. Goriely, A., Tabor, M., *Mathematical modeling of hyphal tip growth*. Fungal Biology Reviews, 2008. **22**: p. 77-83.

48. Hwang, J-U., Wu, G., Yan, A., Lee, Y-J., Grierson, C.S., Yang, Z., *Pollen-tube tip growth requires a balance of lateral propagation and global inhibition of Rho-family GTPase activity*. J. Cell Sci., 2010. **123**: p. 340-350.
49. Klahre, U., Kost, B., *Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN 1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes*. Plant Cell, 2006. **18**: p. 3033-3046.
50. Parre, E., Geitmann, A., *Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of Solanum chacoense*. Planta, 2005b. **220**: p. 582-592.
51. Li, Y-Q., Chen, F., Linskens, H., Cresti, M., *Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants*. Sex. Plant Reprod., 1994. **7**: p. 145-152.
52. Sassen, M.M.A., *Fine structure of Petunia pollen grain and pollen tube*. Acta Botanica Neerlandica, 1964. **13**: p. 175-181.
53. O'Kelley, J.C., Carr, P., *An electron micrographic study of the cell walls of elongating cotton fibers, root hairs, and pollen tubes*. Am. J. Bot., 1954. **41**: p. 261-264.
54. Chanliaud, E., Gidley, M., *In vitro synthesis and properties of pectin/Acetobacter xylinus cellulose composites*. Plant Journal, 1999. **20**(1): p. 25-35.
55. Chanliaud, E., Burrows, K., Jeronimidis G, Gidley MJ, *Mechanical properties of primary plant cell wall analogues*. Planta, 2002. **215**(6): p. 989-96.
56. Geitmann, A., McConnaughey, W., Lang-Pauluzzi, I., Franklin-Tong, V.E., Emons, A.M.C., *Cytomechanical properties of Papaver pollen tubes are altered after self-incompatibility challenge*. Biophys. J., 2004. **86**: p. 3314-3323.
57. Zerzour, R., Kroeger, J., Geitmann, A., *Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties*. Dev. Biol., 2009. **334**: p. 437–446.
58. Chebli, Y., Zerzour, R., Geitmann, A., *Standardization of microscopic cell wall analysis of the Arabidopsis thaliana male gametophyte*. (in preparation).

59. Geitmann, A., Parre, E., *The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements*. Sex. Plant Reprod, 2004. **17**: p. 9-16.
60. Röckel, N., Wolf, S., Kost, B., Rausch, T., Greiner, S., *Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins*. Plant J., 2008. **53**: p. 133-143.
61. Bosch, M., Cheung, A., Hepler, P.K., *Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth*. Plant Physiol., 2005. **138**: p. 1334-1346.
62. Zonia, L., Müller, M., Munnik, T., *Hydrodynamics and cell volume oscillations in the pollen tube apical region are integral components of the biomechanics of Nicotiana tabacum pollen tube growth*. Cell Biochem. Biophys., 2006. **46**: p. 209-232.
63. Klahre, U., Becker, C., Schmitt, A.C., Kost, B., *Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes*. Plant J., 2006. **46**: p. 1018-1031.
64. Geitmann, A., Palanivelu, R., *Fertilization requires communication: Signal generation and perception during pollen tube guidance*. Floriculture and Ornamental Biotechnology, 2007. **1**: p. 77-89.
65. Kha, H., Tuble, S.C., Kalyanasundaram S, Williamson R.E, *WallGen, Software to Construct Layered Cellulose-Hemicellulose Networks and Predict Their Small Deformation Mechanics*. Plant Physiology, 2010. **152**: p. 774-786.
66. Koehl, M.A.R., Quillin, K., Pell, A., *Mechanical design of fiberwound hydraulic skeletons: the stiffening and straightening of embryonic notochords*. Am Zool, 2000. **40**: p. 28-41.
67. Zhou, E.H., Lim, C.T., Quek, S.T., *Finite Element Simulation of the Micropipette Aspiration of a Living Cell Undergoing Large Viscoelastic Deformation*. Mechanics of Advanced Materials and Structures, 2005. **12:6**: p. 501-512.